

# FMVZ



**ANOS**

1963/2013

**UNESP/BOTUCATU**

## **Veterinária e Zootecnia**

**EDIÇÃO COMEMORATIVA**

**AOS 50 ANOS DA FMVZ (1963-2013)**

**Vet e Zootec.**

**2013; 20(Edição Comemorativa): 001-148**

**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**

**ISSN Impresso 0102 -5716**

**ISSN Eletrônico 2178-3764**

**Botucatu - SP – Brasil**

## Veterinária e Zootecnia

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

VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
UNESP – Campus de Botucatu  
18618-970 – Dist. Rubião Jr. – Botucatu – SP – Brasil  
Portal: <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>  
E-mail: [vetzootecnia@fmvz.unesp.br](mailto:vetzootecnia@fmvz.unesp.br)  
Tel. 55 14 3880 2094

Publicação trimestral  
Solicita-se permuta / *Exchange desired*  
Biblioteca do Campus de Botucatu  
18618-970 – Dist. 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. 20, Edição comemorativa, abr. (2013)

ISSN Impresso 0102 -5716

ISSN Eletrônico 2178-3764

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

Os artigos publicados na *Revista VETERINÁRIA E ZOOTECNIA* são indexados por:  
**Current Awareness in Biological Sciences; Index Veterinarius; Veterinary Bulletin.**  
**PERIÓDICA: Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciências; Cambridge Scientific Abstracts; Biosis; CAB Abstracts.**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Administração Geral da UNESP**

**Reitor**

Prof. Dr. Julio Cezar Durigan

**Vice-Reitor**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilza Vieira Cunha Rudge

**Pró-Reitor de Pesquisa**

Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

**Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Prof. Dr. Eduardo Kokubun

**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**

Prof. Dr. Maria Denise Lopes

**Botucatu**  
**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
**FMVZ**  
**2013**

## 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, Gabriele Gimenes Pereira e Maria Paula Toldo Tavares

**Bibliotecária:** Marlucci Betini, Enilze de Souza Nogueira Volpato e Nivaldete Costa Fernandes Cruz.

**Revisor – Espanhol:** Selene Daniela Babboni (FMVZ – UNESP/Botucatu) e Luis Emiliano Cisneros Alvarez (FMVZ – UNESP/Botucatu)

**Secretaria: Apoio SAEPE** – Seção de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão.

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

- Alice Eiko Murakami (UEM/Maringá)  
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)  
Edir Nepomuceno da Silva (FEA – UNICAMP)  
Fumio Honma Ito (FMVZ – USP)  
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)  
João Palermo Neto (FMVZ – USP)  
José Eduardo P. Santos (University of Florida – USA)  
José Luiz Catão Dias (FMVZ – USP)  
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)  
Nivaldo da Silva (UFMG – Escola de Veterinária)  
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)  
Silvio de Arruda Vasconcellos (FMVZ – USP)  
Solange Maria Gennari (FMVZ – USP)  
Walter Motta Ferreira (UFMG – Escola de Veterinária)  
Wilson Roberto Fernandes (FMVZ – USP)

## SUMÁRIO/CONTENTS/SUMARIO

EDITORIAL .....	7
ARTIGOS DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE/ARTÍCULOS DE REVISIÓN	
<b>COMPLEXO <i>Sporothrix schenckii</i>. REVISÃO DE PARTE DA LITERATURA E CONSIDERAÇÕES SOBRE O DIAGNÓSTICO E A EPIDEMIOLOGIA/ SPOROTHRIX SCHENCKII COMPLEX. REVIEW OF THE LITERATURE AND CONSIDERATIONS ON THE DIAGNOSIS AND EPIDEMIOLOGY / SPOROTHRIX SCHENCKII COMPLEJO. REVISIÓN DE LA LITERATURA Y LAS CONSIDERACIONES SOBRE EL DIAGNÓSTICO Y LA EPIDEMIOLOGÍA.</b> Luiz Celso Hygino da Cruz .....	8
<b>CLOSTRIDIOSES DOS ANIMAIS DE PRODUÇÃO. / CLOSTRIDIAL INFECTION IN FARM ANIMALS/ ENFERMEDADES CLOSTRIDIALES DE ANIMALES DE GRANJA.</b> Francisco Carlos Faria Lobato, Felipe Masiero Salvarani, Luciana Aramuni Gonçalves, Prhiscylla Sadanã Pires, Rodrigo Otávio Silveira Silva, Guilherme Guerra Alves, Monique Neves, Carlos Augusto de Oliveira Júnior, Pedro Lúcio Lithg Pereira .....	29
<b>CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS: CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS / ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS: CHARACTERISTICS AND EXPERIMENTAL USE IN ANIMALS. / CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ADULTAS: CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.</b> Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho, Tiago Luis Eilers Treichel, Jaime Sardá Aramburú Junior, Mauricio Borges da Rosa, Fabíola Dalmolin, Maurício Veloso Brun, Alexandre Krause, Ney Luis Pippi .....	49
<b>IMUNODEFICIÊNCIAS PRIMÁRIAS EM EQUINOS. / PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES IN HORSES. / INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS EN EQUINOS.</b> M. Julia B. Felipe.....	60
<b>RETROVIROSES DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS. / RETROVIRUS DE ANIMALES DOMÉSTICOS. / RETROVIRUSES OF DOMESTIC ANIMALS.</b> Rômulo Cerqueira Leite, Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, André Penido de Oliveira, Paula Maria Pires do Nascimento, Fernanda Gonçalves de Oliveira, João Helder Frederico de Faria Naves, Ana Paula de Souza Rodrigues, Marcela Ribeiro Gasparini, Fabiana Alves, Cairo Henrique Sousa de Oliveira, Daniela de Souza Rajão, Grazielle Cossenzo Florentino Galinari.....	73
<b>PATOGÊNESE DA ENTEROPATIA PROLIFERATIVA SUÍNA. / PATHOGENESIS OF PORCINE PROLIFERATIVE ENTEROPATHY. / PATOGÊNESIS DE LA ENTEROPATÍA PROLIFERATIVA PORCINA.</b> Carlos Eduardo Real Pereira, Fabio Augusto Vannucci, João Carlos Pereira da Silva, Roberto Maurício Carvalho Guedes,.....	93
<b>PARASITISMO POR CARRAPATOS EM ANUROS NO BRASIL. / TICKS PARASITIZING ANURANS IN BRAZIL. / PARASITISMO POR GARRAPATAS EN ANUROS EN BRASIL.</b> Hermes Ribeiro Luz, João Luiz Horácio Faccini .....	100
<b>TRAUMA CRANIOENCEFÁLICO EM PEQUENOS ANIMAIS. / TRAUMATIC BRAIN INJURY IN SMALL ANIMALS. / LESIÓN CEREBRAL TRAUMÁTICA EN PEQUEÑAS ESPECIES.</b> Emerson Gonçalves Martins Siqueira, Sheila Canevese Rahal, Flávia Gardilin Vassalo, Fábio André Pinheiro de Araújo, Felipe Stefan Agostinho.....	112
<b>MASTITE BOVINA SOB NANOCONTROLE: A PRÓPOLIS NANOESTRUTURADA COMO NOVA PERSPECTIVA DE TRATAMENTO PARA REBANHOS LEITEIROS ORGÂNICOS/ BOVINE MASTITIS UNDER NANOCONTROL: NANOSTRUCTURED PROPOLIS AS A NEW PERSPECTIVE OF TREATMENT FOR ORGANIC DAIRY CATTLE. / MASTITIS BOVINA BAJO CONTROL: EL PROPÓLEO NANOESTRUCTURADO COMO UNA NUEVA PERSPECTIVA DE TRATAMIENTO PARA GANADO LECHERO ORGÁNICO.</b> Marcella Zampoli Troncarelli, Humberto de Mello Brandão, Juliana Carine Gern, Alessandro de Sá Guimarães, Helio Langoni .....	124

## EDITORIAL

### FMVZ: 50 ANOS DE TRABALHO E CONQUISTAS!

Esta Edição Comemorativa traz nove artigos de revisão em diferentes áreas de abrangência da Revista “Veterinária e Zootecnia”, em momento importante da FMVZ, pois ela completa 50 anos. Meio século de conquistas e de glórias, graças ao trabalho de toda a comunidade especialmente de seus primeiros mentores, professores abnegados que tanto contribuíram na formação de muitos de seus docentes, que se titularam e continuaram juntamente com outros professores a obra aqui implantada.

A FMVZ foi conquistando espaço, e com pioneirismo criou o Programa de Residência em Medicina Veterinária, sendo a primeira faculdade a ter o programa implantado no país. Ela foi modelo para muitas Faculdades no Brasil, pois foi a primeira a ter o seu curso de Medicina Veterinária com cinco anos, sendo o último deles sob a forma de internato com estágios em sua maioria em clínicas, instituições ou empresas fora da unidade, permitindo ao aluno conhecer a realidade da atuação profissional futura.

A qualidade de seu corpo docente e técnico administrativo, aliado ao nível de exigência no vestibular, tem permitido com que os nossos alunos tenham excelente classificação nas provas de avaliação de cursos pelo MEC. Ela festejou em 2012 a obtenção do primeiro lugar entre os cursos de Medicina Veterinária e o décimo lugar entre os cursos de Zootecnia avaliados pelo MEC em 2011.

O desenvolvimento científico e tecnológico tem sido a meta de seus professores, que se destacam na produção científica de alto nível, comparável em muitas situações às pesquisas desenvolvidas em países de primeiro mundo. Atualmente busca-se juntamente com a universidade a sua interacionalização, fato que será decisivo para que ela continue entre as melhores faculdades do país.

Agradecemos a todos que contribuíram permitindo esta edição comemorativa, que marca os seus 50 anos, momento inesquecível principalmente para aqueles professores que foram alunos desta Casa de Ensino que tão bem sabe receber os seus alunos de graduação, pós-graduação e estagiários que nela vem para aprender, crescer e conquistar o mundo.

Obrigado e Parabéns FMVZ, e a todos aqueles que fizeram e fazem parte da sua história. É gratificante participar deste momento e poder continuar fazendo parte deste time que deseja manter o seu brilho e sua importância no cenário nacional.

**Prof. Helio Langoni**  
Editor-Chefe

## COMPLEXO *Sporothrix schenckii*. REVISÃO DE PARTE DA LITERATURA E CONSIDERAÇÕES SOBRE O DIAGNÓSTICO E A EPIDEMIOLOGIA

Luiz Celso Hygino da Cruz<sup>1</sup>

### RESUMO

Esporotricose é uma infecção iniciada pela inoculação traumática do fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* e é largamente distribuída pelo mundo. Durante a última década ocorreu um significativo aumento dos casos clínicos de esporotricose no Brasil, particularmente no Estado do Rio de Janeiro onde vem se manifestando uma epidemia em seres humanos correlacionada com a transmissão por gatos. Atualmente esta micose deve ser considerada uma zoonose importante, especialmente nas áreas em que ela é considerada endêmica. Importantes transformações têm sido observadas no conjunto dos aspectos relacionados à ecoepidemiologia da doença, especialmente nas formas de disseminação e transmissão. A partir do sequenciamento de genes demonstrou-se que a espécie *S. schenckii* constitui um complexo que é composto das seguintes espécies crípticas: *Sporothrix albicans*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana* e *S. schenckii*. Com o aumento do número de espécies patogênicas, modificam-se os procedimentos da rotina diagnóstica da esporotricose com a inclusão de novos aspectos relacionados à morfologia, fisiologia e nutrição.

**Palavras-chave:** *Sporothrix schenckii*, aspectos clínicos, diagnósticos e epidemiologia.

## SPOROTHRIX SCHENCKII COMPLEX. REVIEW OF THE LITERATURE AND CONSIDERATIONS ON THE DIAGNOSIS AND EPIDEMIOLOGY

### SUMMARY

Through sequencing of genes, one has been demonstrated that the species *S. schenckii* is a complex that consists of the following cryptic species: *Sporothrix albicans*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana* and *S. schenckii*.

Sporotrichosis is an infection initiated by traumatic inoculation of dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* and is widely distributed throughout the world. During the last decade there has been a significant increase in clinical cases of sporotrichosis in Brazil, particularly in the State of Rio de Janeiro where an epidemic has manifested itself in humans, which correlates with transmission by cats. Currently this mycosis should be considered an important zoonosis, especially in areas where it is endemic. Important changes have been observed in all the aspects related to ecoepidemiology of these disease, especially in their dissemination and transmission. With the increasing number of pathogenic species, routine diagnostic procedures of sporotrichosis have changed, with the inclusion of new aspects of morphology, physiology and nutrition.

**Keywords:** *Sporothrix schenckii*, clinical and epidemiological aspects, diagnosis.

<sup>1</sup> Prof. Emérito da UFRRJ; Prof. Titular da UNESA. hyginodacruz@gmail.com



# SPOROTHRIX SCHENCKII COMPLEJO. REVISIÓN DE LA LITERATURA Y LAS CONSIDERACIONES SOBRE EL DIAGNÓSTICO Y LA EPIDEMIOLOGÍA

## RESUMEN

La esporotricosis es una infección causada por la inoculación traumática del hongo dimórfico *Sporothrix schenckii* que está ampliamente distribuido alrededor del mundo. Durante la última década se identificó un aumento significativo de casos clínicos de esporotricosis en Brasil, particularmente en el Estado de Rio de Janeiro, donde se han manifestado brotes epidémicos en seres humanos, relacionados a la transmisión por gatos. Actualmente esta micosis se debe considerar una zoonosis importante, especialmente en las zonas donde es endémica. Por otro lado, se han observado cambios importantes en todos los aspectos relacionados con la ecoepidemiología de esta enfermedad, sobre todo en su difusión y transmisión. A través de la secuenciación de genes, se ha demostrado que la especie *S. schenckii* constituye un grupo que consta de las siguientes especies crípticas: *Sporothrix albicans*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana* y *Sporothrix schenckii*. Con el aumento en el número de especies patógenas, los procedimientos diagnósticos de rutina para la esporotricosis han cambiado, con la inclusión de nuevos aspectos morfológicos, fisiológicos y nutricionales

**Palabras clave:** *Sporothrix schenckii*, clínica, epidemiología, diagnóstico.

## INTRODUÇÃO

Esporotricose é uma doença infecciosa crônica do homem e de animais associada, em geral, à implantação traumática a partir da pele, de um fungo, o *Sporothrix schenckii*, que habita o solo e superfícies de plantas. Com a invasão da derme e do tecido subcutâneo, a doença pode evoluir de forma localizada ou mesmo generalizar-se ou, como é mais comum, pode ocorrer evolução para uma forma cutâneo-linfática. Há outras manifestações clínico-patológicas menos frequentes e, dentre elas deve-se destacar a forma respiratória que pode ser adquirida pela inalação de propágulos fúngicos eliminados por animais mediante espirros provocados por lesões nasais (1).

Em publicação de 1898, Schenck (2) atribuiu a um fungo a responsabilidade etiológica por um quadro patológico semelhante ao que hoje reconhecemos como sendo típico da esporotricose. Dois anos mais tarde, o fungo observado por Schenck foi classificado por Hektoen e Perkins (3) como *Sporothrix schenckii*. No Brasil, as primeiras informações sobre a esporotricose datam de 1907 quando Lutz e Splendore (4) relataram as primeiras ocorrências do fungo em pacientes brasileiros. Desde então, relatos de novos casos clínicos vêm ocupando as páginas dos periódicos científicos no Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo (5-7), culminando com a recente caracterização epidemiológica de uma epidemia na região do Grande Rio (área metropolitana e municípios vizinhos) (8-14). Nesta região a doença tem afetado principalmente gatos e o homem e, em menor proporção, os cães.

Desde os primeiros relatos e, por mais de cem anos, o gênero *Sporothrix* foi considerado ter somente uma espécie patogênica: *Sporothrix schenckii* que sempre foi reconhecida como uma espécie uniforme em suas características fenotípicas. Em todos os casos em que esta espécie foi estudada após isolamentos a partir de materiais obtidos de lesões no homem e nos animais ou mesmo do meio ambiente e oriundos de todos os lugares no mundo, os critérios utilizados para a classificação do gênero e de suas espécies sempre foram baseados em aspectos fenotípicos como as características coloniais, pigmentação, a

morfologia microscópica e o seu termodimorfismo quando ele se torna leveduriforme a 37° C e micelial em cultivos à temperatura ambiente.

### Taxonomia polifásica

Entre os seres vivos não existem classes ou famílias e nem qualquer outro tipo de organização, ao contrário há uma interrelação entre todos eles e não se consegue visualizar linhas delimitatórias bem definidas a separar com nitidez os diferentes grupos encontrados nos sistemas taxonômicos. Estes foram idealizados pelo homem para dar uma certa ordem aos seus conhecimentos acumulados sobre cada um dos seres vivos conhecidos. Quando Lineu estabeleceu seu conceito de espécies, ele acreditava que os aspectos morfológicos seriam suficientes para defini-las, entretanto, como novos conhecimentos foram produzidos continuamente e novos conceitos foram e continuam sendo elaborados ou modificados periodicamente, as classificações dos seres vivos devem ser modificadas com frequência para que elas permaneçam atualizadas (15). Ao contrário de outros ramos da Biologia, ainda não ocorreu na Micologia um consenso para a unificação dos diversos sistemas de classificação, o que tem levado a algumas confusões. Dois critérios principais são considerados para a classificação dos fungos: o morfológico para os de morfologia filamentosa e o nutricional para os que são unicelulares. Os maiores problemas ocorrem no primeiro grupo, pois, muitas vezes, as diferenças entre espécies e mesmo entre gêneros é baseada tão somente em pequenos e tênues detalhes e, como se sabe, variações morfológicas podem ocorrer pela influência de vários fatores como as condições de cultivo, composição do meio de cultura, temperatura de incubação, umidade, pH, pressão osmótica do meio e outros.

Recentemente, muito se tem investido na Micologia em estudos sobre a biologia molecular, particularmente nos campos da genômica, além da proteômica e metabolômica, gerando novos conhecimentos e, por isso mesmo, novos parâmetros passaram a fazer parte das modernas chaves taxonômicas. Diversas técnicas da biologia molecular tornaram-se de uso comum na identificação de diversos grupos de fungos de interesse médico e veterinário. Com a utilização rotineira desses novos procedimentos como a reação da polimerase em cadeia (PCR) e o sequenciamento de genomas, a sistemática de vários grupos de fungos está passando por profundas transformações e diversas espécies novas têm sido propostas. Em anos recentes, foram identificadas várias sequências gênicas que passaram a ser utilizadas como marcadores moleculares de fungos, destacando-se entre elas a calmodulina, a  $\beta$ -tubulina, a quitina sintase e o fator de alongação (EF-1a) (16-19). Diversas outras técnicas têm sido empregadas para a identificação do *S. schenckii*, destacando-se entre elas a imunofluorescência (20), a eletroforese em campo pulsado (21) e RFLP mitocondrial (22, 23).

Por si só, nenhuma das diversas técnicas utilizadas conseguiu gerar informações suficientes para definir e classificar as espécies fúngicas. É indispensável juntar diferentes características, morfológicas, ecológicas, bioquímicas, fisiológicas, nutricionais, genéticas e outras, numa análise multifatorial que pode ser denominada de "taxonomia polifásica", cuja aplicação é cada vez mais frequente na micologia médica (24).

A heterogeneidade morfológica e genética de cepas de *S. schenckii* isoladas a partir de material patológico foi registrada em diversos trabalhos publicados ao longo dos últimos anos (25, 26). A primeira observação (18) indicando que o *S. schenckii* seria um complexo de espécies distintas foi feita com base em análise filogenética empregando uma combinação de sequências de DNA de três loci (quitina sintase,  $\beta$ -tubulina e calmodulina) obtidas com o estudo de sessenta cepas de *S. schenckii* isoladas em diversos países. Posteriormente, foi constatado que bastaria uma análise sequencial do locus calmadulina para reconhecer todas as espécies de interesse médico que compõem o complexo *Sporothrix schenckii* (16).

Recentemente (16), depois da análise de parâmetros fenotípicos e genotípicos estudados em 127 culturas de *S. schenckii*, isoladas de casos clínicos em várias regiões do

mundo, foi proposta a criação de três novas espécies, além do *S. schenckii*: *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*. A distinção entre estas espécies foi baseada nos seguintes aspectos:

- a) sequenciamento do gene da calmodulina;
- b) perfil de assimilação de fontes de carbono (sacarose, rafinose e ribitol) tendo como meio básico o Yeast Nitrogen Base (YNB);
- c) diâmetro médio das colônias, após incubação nas temperaturas de 20, 30, 35 e 37° C por 21 dias no meio agar batata dextrose (PDA) e
- d) morfologia dos conídios nos cultivos em meio PDA.

Posteriormente (27), foi proposto que a variante morfológica denominada *S. schenckii* var. *luriei* fosse transformada em uma nova espécie com a denominação de *S. luriei* com base nas seguintes características: assimila ribitol e não assimila rafinose e sacarose; produz colônias com diâmetro de 51mm a 30° C, de 35-36 mm a 35° C e 21 mm a 37° C; produz conídios simpodiais e sésseis, obovóides hialinos.

Com base nos recentes estudos sobre a genômica e analisada com base nos conceitos modernos da taxonomia polifásica que inclui, além do sequenciamento de DNA, informações sobre morfologia, nutrição e fisiologia, a espécie *S. schenckii* passou a ser considerada como um complexo de espécies crípticas. Desta maneira, o complexo *S. schenckii* passou a ser constituído pelas seguintes espécies: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. luriae* e *S. albicans* (16).

Considerando os novos critérios de identificação das espécies do complexo *S. schenckii*, dois grupos de pesquisadores brasileiros re-estudaram as culturas mantidas em suas micotecas. Em São Paulo, Rodrigues (28) estudou 161 cepas de *Sporothrix* spp. provenientes de amostras clínicas e ambientais de diversas regiões do Brasil e de outros países. Demonstrou que as espécies *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. schenckii* tinham ampla distribuição geográfica no país. registraram, também, que a espécie *S. brasiliensis* foi isolada com alta frequência de gatos nos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, sugerindo que este animal poderia ser um importante reservatório na epidemiologia da esporotricose. No Rio de Janeiro, Oliveira et al. (29) desenvolveram um trabalho semelhante ao analisarem 246 culturas isoladas no Rio de Janeiro, no período de 1998 e 2008 e, como resultado, reclassificaram 230 delas como *Sporothrix brasiliensis*, 15 como *S. schenckii* e 1 como *S. globosa*.

## Epidemiologia

**Reservatórios naturais do fungo, transmissão e fontes de contaminação** - Até bem pouco tempo atrás, a única espécie do gênero *Sporothrix* considerada patogênica para o homem e animais domésticos era o *Sporothrix schenckii*. Hoje devemos considerar a antiga espécie, até então conhecida como *Sporothrix schenckii*, como um complexo de seis espécies crípticas. Isto é, seis espécies com características morfológicas muito parecidas, mas bem distintas quanto aos aspectos genotípicos. De um momento para outro, constatar que existe pluralidade onde se imaginava haver unicidade pode alterar conceitos e modificar certezas há anos bem estabelecidas. De imediato, a diversidade de espécies que passou a compor o novo complexo *S. schenckii* traz, para o cenário da epidemiologia das micoses, novas e instigantes questões sobre a esporotricose. Qual seria a distribuição dessas novas espécies pelo mundo? Todas elas ocorrem no Brasil ou só algumas delas? Como seria a distribuição geográfica de cada espécie pelo Brasil? Elas teriam predileção por alguma espécie animal? Se todas são patogênicas para o homem, qual seria o grau de importância de cada uma delas? Quanto à sensibilidade aos medicamentos, haverá diferenças entre elas?

Por necessitar de elevada umidade relativa ambiental (95-100%) (30) o *S. schenckii* tende a se desenvolver melhor em regiões onde ocorrem as condições climáticas que lhe são

mais favoráveis. O solo sempre foi considerado um dos principais reservatórios de *S. schenckii* (31), constituindo-se numa importante fonte de contaminação, além das plantas que são também reconhecidas como importantes reservatórios desse fungo (32). Para que se desenvolva bem em sua forma micelial, o *S. schenckii* necessita que o solo seja rico em matéria orgânica (33). Ele pode ser encontrado como saprófita na superfície de vegetais vivos ou sobre restos de plantas mortas e em decomposição (32), no feno, na madeira, em excrementos de animais e em muitos outros materiais de origem vegetal (32, 33).

Todas as referências sobre a epidemiologia da esporotricose indicam que a doença não tem um comportamento único quando se considera a forma como os animais e o homem podem se contaminar com o fungo. Na maioria das vezes, a esporotricose ocorre de forma isolada, quando a doença é adquirida por meio de traumatismos com plantas e madeiras ou por arranhaduras e mordeduras de animais portadores ou infectados. Individualmente, também, a doença pode ser adquirida pelo manuseio de culturas do fungo em laboratórios (34). A esporotricose é observada mais comumente em indivíduos que têm contato constante com plantas e, por causa disso, ela é considerada uma doença ocupacional e ocasional, quando ela pode ser adquirida por meio de lesões traumáticas provocadas por vegetais (35). Tradicionalmente a doença é conhecida como a "doença do jardineiro", assim denominada porque ela é frequentemente observada entre os que trabalham no cultivo de plantas ornamentais, especialmente da roseira. Classicamente, portanto, considera-se que a esporotricose é uma doença adquirida pela implantação traumática do fungo no tecido subcutâneo pelo contato com um material qualquer, que seja contaminado pelo fungo.

Até recentemente, considerava-se que a maioria das infecções ocorria por meio de ferimentos por espinhos, farpas de madeiras e outros materiais de origem vegetal, porém outras formas incomuns de inoculação também já foram descritas, como picada de inseto e outras formas de transmissão por animais como roedores, cães, tatus, cavalos e aves (35). Ao longo dos anos, diversos pesquisadores fizeram referências ao papel dos gatos na transmissão da esporotricose (36-38).

Os raros episódios considerados epidêmicos que tiveram registros foram provocados pelo contágio por meio de uma mesma fonte de contaminação (39, 40). Foi assim na epidemia ocorrida entre os anos de 1941 e 1944 em uma mina de ouro no Transvaal quando 2825 mineiros adquiriram a esporotricose. Nesse episódio ficou demonstrado que o fungo foi introduzido na mina junto com a madeira usada na sustentação dos túneis e, como a umidade no local atingia 100%, o ambiente era favorável à multiplicação e esporulação do fungo, facilitando a contaminação de tantos trabalhadores (41).

Em outro episódio com características diferentes, foram afetados 84 trabalhadores que participavam de um programa de reflorestamento nos Estados Unidos em 1988, que se contaminaram com o *S. schenckii* pela exposição ao musgo esfagno que era usado para a embalagem de sementes (42).

### **Epidemiologia da esporotricose em gatos**

Os parâmetros epidemiológicos atuais relativos à esporotricose felina, no Rio de Janeiro, parecem diferir do padrão conceitual predominante. A contaminação pelo contato com plantas não parece ser a forma de disseminação principal desta micose entre os gatos, sendo mais provável que a transmissão se dê pelo contato entre animais sadios e infectados. Na superfície das lesões ulceradas, quase sempre presentes nesses animais, há grande número de células fúngicas leveduriformes que, pelo contato direto, podem ser transferidas de um animal para outro. Esta forma de transmissão é grandemente facilitada pelo comportamento desta espécie animal cujos adultos saem durante a noite em busca de caça ou em função dos rituais reprodutivos, quando a fêmea em cio, costuma atrair os machos que irão disputá-la em brigas acirradas. Nestas ocasiões, animais portadores de lesões ulceradas poderão transmitir a

esporotricose pelo contato com as leveduras presentes na superfície das lesões ulceradas ou pelos ferimentos produzidos por mordeduras ou arranhaduras de gatos doentes (15). Como se sabe, o felino não se fixa à casa onde vive, como faz o cão, ele sai de casa, caminha pela rua, caça pássaros, ratos e outros pequenos animais, se relaciona com outros gatos e, eventualmente, volta para casa onde ele sabe que terá abrigo e comida.

Nos últimos anos, a população de gatos nas ruas e praças tem aumentado consideravelmente alterando, dessa maneira, as relações epidemiológicas de algumas doenças infecciosas e parasitárias que atingem esta espécie animal. Assim, a epidemiologia da esporotricose com relação à população de felinos no Rio de Janeiro não parece seguir os padrões aceitos para esta espécie em si e para as relações entre ela e os outros animais, inclusive com o homem (15).

O padrão epidemiológico desta micose sempre considerou o contato com plantas, a forma principal de contágio. Com certeza, esta ainda é uma das formas comuns de contaminação de humano e de animais, mas quando se analisa a situação observada na cidade do Rio de Janeiro e nos municípios vizinhos, fica claro que esta não deve ser a forma de contágio mais importante entre os gatos. Além da elevada proliferação destes animais em praças e terrenos baldios, ainda há o hábito de pessoas recolherem animais (sadios ou doentes) das ruas, abrigando-os em casas ou apartamentos, formando colônias numerosas, sem qualquer controle sanitário. Em decorrência desta situação, gatos portadores de esporotricose com lesões ulceradas, quando são introduzidos nestas colônias disseminam a infecção para os outros animais.

Situação bastante comum é aquela em que o proprietário de um animal com esporotricose resolve soltá-lo longe de sua casa ao tomar conhecimento dos riscos de contágio para ele e seus familiares, do longo período necessário para que o tratamento tenha sucesso e de seus custos que podem ser elevados (11, 15). Dos pacientes com suspeita de esporotricose que procuram a Fiocruz para um primeiro atendimento, cerca de 70% deles já haviam dado um destino inadequado ao seu animal, perpetuando o ciclo de transmissão da doença (43).

No período compreendido entre os anos de 2005 e 2012, o laboratório de Análises Clínicas - Labovet, com sede em Campo Grande, Rio de Janeiro recebeu um número crescente de materiais coletados de gatos com suspeita clínica de esporotricose que eram encaminhados por clínicas veterinárias de vários bairros da Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro. Durante este período de 8 anos foram analisados, por citologia e cultivo, um total de 741 materiais coletados, com swabs, da superfície de lesões cutâneas ulceradas. Deste total, o *S. schenckii* foi isolado 325 vezes (43,86%).

A epidemia de esporotricose em gatos, no Rio de Janeiro, não atinge a Zona Sul, a região mais rica da cidade. Ao contrário, ela se estende continua e progressivamente pelos bairros mais pobres das Zonas Oeste e Norte (Sepetiba, Santa Cruz, Bangu, Campo Grande) e municípios da Baixada Fluminense (Caxias, Nilópolis, São João de Meriti, Nova Iguaçu, Mesquita, Belford Roxo, Itaguaí) (43). Por que a esporotricose praticamente não é diagnosticada na Zona Sul e tornou-se epidêmica nos bairros e cidades mais pobres? Na Zona Sul os gatos vivem em apartamentos e não costumam ir à rua desacompanhados de seus donos e nos bairros e cidades periféricas porque a população vive em casas, os gatos são mais livres, eles estão nos quintais e vão à rua com frequência e sozinhos. Nesses locais, os cães sempre predominaram porque eram importantes como animais de guarda, mas, aos poucos, a presença dos gatos foi se expandindo e muitas casas passaram a ter cães e também gatos. Estes eram introduzidos como uma forma eficiente de controle de ratos. Os gatos passaram a ser vistos como animais tão úteis como eram os cães. O comportamento deles, entretanto, é bem diferente do cão, ele não permanece restrito à sua casa e ao seu quintal, ele sai para a rua, para o quintal do vizinho, ele foge de casa e vai viver livre, ele não se submete ao homem como faz o cão. O aumento do número de casos de esporotricose nas regiões mais pobres do Grande Rio pode ter aí a sua origem.

Gatos de rua costumam procurar locais arborizados onde eles encontram a proteção das plantas e árvores. Não costumam viver isolados, preferem formar grupos como se fossem famílias e, rapidamente elas se tornam numerosas. Se um dos membros da família se torna infectado pelo *Sporothrix sp* ao se ferir em uma planta, ou se um gato doente é introduzido no grupo por ter sido abandonado por seu proprietário, a esporotricose poderá atingir outros animais do grupo por contato direto ou porque o animal infectado pode espalhar o fungo pelo ambiente pelo contato com plantas ou com o solo. As plantas passariam a ter uma carga maior de células fúngicas em suas superfícies, assim como as cascas das árvores, local por onde os gatos costumam subir utilizando suas garras para se fixarem, desta maneira, as garras se transformam em perigoso instrumento de inoculação do fungo. Portanto, um maior número de animais infectados no meio ambiente, corresponderá a uma maior carga de células fúngicas que serão liberadas no meio ambiente. Então, no meio ambiente teremos, de um lado, as plantas e os solos disponibilizando células fúngicas em maior número, o que aumenta as chances dos animais e do homem se contaminarem e, do outro, os próprios animais que estão doentes, mas continuam em contato com os outros membros do grupo, continuarão disseminando o fungo para os indivíduos sadios. Os animais que morrem no ambiente da colônia também contribuem para o aumento da população fúngica presente no solo. Sabe-se que não é prática corrente a cremação de animais mortos, mesmo que seja portador de alguma doença transmissível ao homem. É comum a presença de animais em avançado estado de decomposição em importantes vias de circulação de qualquer cidade brasileira. Animais mortos são frequentemente jogados na lata de lixo e é exatamente isto o que acontece com a maioria dos gatos que morrem de esporotricose. A cremação deveria ser obrigatória, como também deveria ser programa obrigatório de todas as Secretarias de Saúde dos Estados e Municípios, o controle da população de animais que vivem soltos nas ruas como os cães, gatos e pombos.

Atualmente a esporotricose é uma das principais doenças de gatos domésticos e deve ser considerada ainda mais séria porque trata-se de uma zoonose que é transmitida por animais que vivem dentro das residências em estreita relação com o ser humano (35, 38). A esporotricose humana no Rio de Janeiro também tem sido diagnosticada em números crescentes, sugerindo existência de uma correlação com o aumento da sua incidência entre os felinos, uma vez que estes animais vivem em estreita relação com o homem (8-11).

### **O gato como reservatório e transmissor zoonótico**

É provável que a ocorrência da esporotricose humana, antes de 1998, tenha sido rara e restrita a trabalhadores rurais e pessoas que adquiriam a doença pela forma de transmissão tradicional por meio de traumatismos com materiais de origem vegetal. As epidemias que tiveram o envolvimento de numerosos casos humanos e que atingiram extensas áreas geográficas eram, sempre, correlacionadas com a contaminação ambiental (40). Esporadicamente, esta micose teve a sua forma de transmissão associada a arranhaduras ou mordeduras de animais (5, 9, 35, 38, 44). A potencialidade zoonótica da esporotricose felina passou a ser reconhecida a partir da década de 80 quando a doença em seres humanos foi pela primeira vez associada ao contato com gatos infectados (36).

A potencialidade zoonótica de gatos portadores de esporotricose nunca passou de meras conjecturas ou, no máximo, foi considerada uma possibilidade de menor importância. A transmissão dessa micose de gatos para o homem sempre foi considerada um acontecimento eventual, mas com o aumento da presença de animais contaminados em consultórios ou internados em clínicas veterinárias, passamos a ter de considerar os profissionais da área, veterinários e enfermeiros, e até mesmo os proprietários dos animais, como as mais novas categorias de risco de contraírem a esporotricose (44, 45).

Gatos acometidos de esporotricose constituem um importante reservatório da doença

tendo o fungo sido isolado a partir de 100% das lesões cutâneas, 66,2% das cavidades nasais, 41,8% das cavidades orais e 39,5% das unhas destes animais. Em estudos recentes foi comprovada a existência de semelhança genética entre as cepas de *S. schenckii* isoladas de gatos e as obtidas de seus donos com a micose (46).

Além de lesões cutâneas, o fungo pode ser, ocasionalmente, inalado, infectar os pulmões e depois disseminar-se para outros órgãos (46).

Em uma epidemia de esporotricose envolvendo 347 gatos entre 1998 e 2001, foi constatado (12) que, em 154 deles, havia sinais de envolvimento do aparelho respiratório. Como é comum nas infecções do aparelho respiratório, o comprometimento das vias aéreas superiores costuma trazer desconforto e, por causa disso, o animal tende a espirrar eliminando perdígotos contaminados com o micro-organismo infectante. Acredito que esta poderia ser uma das formas possíveis de transmissão da esporotricose do gato para outros animais e, também, para o homem, principalmente quando este apresenta lesões na face sem nenhuma história de arranhadura ou de mordedura.

No período de 1998 a 2009 o Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fiocruz diagnosticou a esporotricose em aproximadamente 2200 seres humanos, em cerca de 3244 gatos e em mais de 120 cães. De acordo com a opinião da equipe de pesquisadores desta instituição, os cães não desempenham um papel importante na cadeia epidemiológica desta micose, não existindo comprovação de ter ocorrido qualquer transmissão ao ser humano por esses animais (14). Ao se transformar numa instituição de referência em Esporotricose, este laboratório da Fiocruz passou a receber grande número de casos clínicos de esporotricose humana e animal que eram encaminhados principalmente por clínicas veterinárias sediadas na região metropolitana do Grande Rio. Creio que os principais motivos que fizeram os veterinários direcionarem seus casos clínicos de esporotricose para a Fiocruz foi a educação profissional recebida nas disciplinas de Micologia das Faculdades de Veterinária e a divulgação do problema pela imprensa, especialmente pelo jornal "Extra" cuja circulação é maior nas áreas da cidade onde a esporotricose é endêmica. O artigo sobre esporotricose em gatos que foi publicado pelo jornal em 1999 pode ter contribuído para que os proprietários passassem a ter mais atenção ao problema e os veterinários tivessem como referencial o laboratório de micologia da Fiocruz. Os casos de esporotricose encaminhados à Fiocruz (e aos laboratórios particulares de análises clínicas) foram aumentando gradativamente e, em consequência, a instituição produziu nos últimos anos diversos estudos sobre clínica, patologia e epidemiologia da doença em seres humanos e animais. Dentre as diversas contribuições de seu grupo de pesquisadores, destacam-se as observações sobre a ocorrência da doença em seres humanos e em gatos que, de tão elevada, fez o grupo sugerir que o estado atual da doença na região metropolitana do Rio de Janeiro passasse a ser considerado como uma situação de endemia.

Quanto à forma de transmissão da esporotricose, os trabalhos publicados nos últimos anos indicam ser o gato o principal transmissor da doença para o homem e para outros animais, inclusive o próprio gato (8-10, 14, 47, 48).

Maiores evidências sobre o envolvimento de gatos na transmissão da esporotricose para seres humanos fazem parte de relatos encontrados na literatura produzida pelo grupo da Fiocruz desde 2001. Assim, foi registrada (8) a ocorrência de 13 casos de esporotricose humana entre 1987 e 1998, com dois deles associados a arranhaduras por gatos e a outros 66 casos humanos, 117 em gatos e 7 em cães registrados no período compreendido entre julho de 1998 e julho de 2000, com 52 (78,8%) pessoas relatando contato com gatos infectados e 31 (47%) com história de mordedura ou arranhadura por gatos (8). Após estudarem 24 casos de esporotricose humana com lesões cutâneas disseminadas, Barros et al. (47) concluíram pela participação efetiva de gatos na transmissão da doença, visto que todos os pacientes relataram contato prévio com gatos infectados e 17 deles foram mordidos ou arranhados por um animal infectado (47). Um ano depois, os mesmos autores (9) voltam a fazer referências à

transmissão zoonótica isolada da esporotricose ou em pequenos surtos e chamam a atenção para o grande aumento da incidência de casos humanos na região metropolitana do Rio de Janeiro e a sua correlação com o aumento concomitante da casuística em gatos. Registram que no período entre 1998 e 2001, foram diagnosticados 178 casos de esporotricose humana com 156 situações de envolvimento domiciliar ou profissional com gatos portadores de esporotricose. Relatos de arranhaduras ou mordeduras foram feitos por 97 dos indivíduos infectados.

Em trabalho publicado em 2008, Schubah, Barros e Wanke (14) registraram que no período de 1998 a 2004 foram diagnosticados no laboratório de Micologia Médica da Fiocruz, 759 casos de esporotricose em humanos, 64 em cães e 1503 em gatos. Deste total de casos, 85% dos cães e 83,4% dos pacientes humanos, tiveram contato com gatos com esporotricose. Deve-se salientar que 55,8% dos pacientes humanos relataram que foram mordidos ou arranhados por gatos portadores desta micose (14).

Em outro artigo, Barros et al. (10) descreveram o que consideraram ser a primeira epidemia de esporotricose observada em seres humanos no Rio de Janeiro, em 1998, resultante de transmissão zoonótica. O estudo foi baseado em informações fornecidas por 255 pessoas, incluindo 94 com esporotricose e 161 saudáveis que viviam em 73 habitações junto com 133 gatos com esporotricose. A prevalência de esporotricose foi quatro vezes maior entre os pacientes que cuidavam de animais, independentemente do sexo.

Análises epidemiológicas envolvendo 81 casos de esporotricose diagnosticadas em crianças menores de 15 anos no período de 1998 a 2004 permitiram que se concluísse que esta teria sido a maior série de casos de esporotricose em crianças com transmissão zoonótica (48).

Em publicação recente, o grupo da Fiocruz (11) informou que no período entre 1998 e 2009 foram diagnosticados cerca de 2.200 casos de esporotricose em seres humanos e 3.244 em gatos, com maior concentração desses casos na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro e apresentaram dados estatísticos que elevam a esporotricose no estado do Rio de Janeiro à condição de epidemia.

Nas regiões sul e sudeste, onde foram registrados a maioria dos casos da doença em humanos, talvez as condições climáticas, em especial a temperatura e a umidade do ar, sejam mais favoráveis ao desenvolvimento e à expansão do fungo na natureza do que em outras regiões do país. Se isto de fato for verdadeiro, as possibilidades de gatos se infectarem a partir do contato direto com solos e plantas ou com outros animais doentes podem ser maiores, transformando-os, posteriormente, nos principais agentes de transmissão da doença para humanos. Acredita-se que o gato atue como um hospedeiro chave na ecoepidemiologia da doença nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul.

Estudos realizados recentemente (28) indicaram que a espécie filogenética *S. brasiliensis* ocorre com maior frequência nas regiões Sul e Sudeste e que a maioria das culturas isoladas (90%) foram obtidas de casos clínicos de esporotricose felina. O fato de no estado do Rio de Janeiro esta mesma espécie ser predominante em casos de esporotricose humana, é indicativo de que o principal reservatório de disseminação da esporotricose em seres humanos deve ser mesmo o gato.

Em São Paulo, ao contrário, como não ocorre uma epidemia de esporotricose felina e a espécie predominante na esporotricose humana é *S. schenckii*, a fonte de infecção não deve ser o gato, mas qualquer outra com destaque para as condições ambientais para a manutenção do agente na natureza.

### Diagnóstico da Esporotricose e Aspectos patológicos

O diagnóstico clínico da esporotricose, baseado na patogenia e nas alterações patológicas, deve ser confirmado pela observação microscópica de estruturas leveduriformes no material coletado das lesões e no isolamento e identificação do agente etiológico envolvido



no processo.

De maneira geral, a infecção se inicia com uma lesão traumática por vegetais ou decorrente de ferimentos obtidos durante brigas entre animais. Por ser um fungo dimórfico, que é micelial quando em vida livre junto aos vegetais e leveduriforme quando se encontra na fase parasitária, o *S. schenckii* será introduzido no tecido animal ou numa forma ou na outra, dependendo do tipo de contágio. Entretanto, se o contágio for pelo contato do animal sadio recém ferido, com um animal portador de lesões ulceradas, um grande número de células leveduriformes será transferido diretamente para o tecido lesionado. Neste novo tecido, as leveduras começarão a multiplicar-se de imediato porque elas não necessitarão nem de uma fase de adaptação a um novo tipo de tecido e nem de fazer a transformação de um tipo celular (micelial) para outro (leveduriforme). Entretanto, quando a contaminação acontece por meio de um ferimento produzido por uma planta contaminada pelo *S. schenckii*, como ali o fungo se encontra na forma micelial, há necessidade de sua transformação em levedura para que ocorra a sua multiplicação. Desta maneira, o período de incubação para o desenvolvimento da esporotricose infecção deve ser maior quando a infecção acontece por meio de ferimentos provocados por vegetais, do que pelo contato com um outro animal com esporotricose ulcerativa (15).

Na forma linfática, no local de penetração há formação de pequenos nódulos medindo de 1 a 2 cm de diâmetro e ocorre invasão dos vasos linfáticos com desenvolvimento de granulomas adjacentes e comprometimento dos linfonodos regionais. Os granulomas apresentam-se endurecidos à palpação e com mobilidade sob a pele ou podem tornar-se amolecidos, aderentes à derme e ulcerados. Em certos casos pode ocorrer generalização da infecção.

Em animais imunossuprimidos pode haver disseminação hematogênica com o desenvolvimento de lesões ósseas e articulares, envolvimento do sistema nervoso central e das meninges, além do aparelho genito-urinário e presença de granulomas em órgãos como o fígado. A forma pulmonar, que é rara, resulta da inalação de partículas contaminadas pelo fungo.

Quanto aos aspectos patológicos, em uma análise dos numerosos casos de esporotricose humana diagnosticados nos últimos anos na Fiocruz, verificou-se um predomínio das formas **linfocutânea** (65,8%) e **cutânea fixa** (25,4%). A forma **cutânea disseminada** foi evidenciada em 7,2% dos casos, em indivíduos sem imunossupressão, uma forma que talvez seja consequência de lesões produzidas pela multiplicidade de formas de inoculação como mordeduras e arranhaduras de gatos. A forma **extracutânea** ocorre em 1,5% dos casos envolvendo, principalmente, a conjuntiva ocular. Nestes casos, a transmissão poderia ter ocorrido por meio de espirros que são comuns em gatos com lesões no trato respiratório (12, 43).

Com relação aos felinos, o primeiro caso de esporotricose espontânea em gatos foi descrita por Singer e Muncie (49). Desde este primeiro relato, a esporotricose felina foi classificada como uma doença esporádica e rara em todo o mundo porque para a sua implantação, havia necessidade de uma solução de continuidade cutânea por onde o fungo deveria penetrar quando ocorresse contato com uma planta contaminada. Até a década de 1980, este era também o padrão epidemiológico observado na região do grande Rio (Rio de Janeiro e cidades adjacentes), tanto que era justificável a publicação de trabalhos com apresentação de casos clínicos isolados (50). Após a década de 1990, ao contrário, a doença passou a ser diagnosticada com elevada frequência e constatada uma incidência muito superior a todos os padrões epidemiológicos conhecidos em relação à doença. O elevado número de casos desta micose em gatos tem despertado o interesse dos clínicos, micologistas, patologistas e epidemiologistas. Nestes animais, a forma cutâneo-linfática é a mais frequente (Fig. 1).

Numa análise retrospectiva dos numerosos casos de esporotricose diagnosticados em gatos na Fiocruz no período de 1998 a 2001, foram identificados 10 portadores assintomáticos e 91 assintomáticos e aparentemente saudáveis (12, 51). Entre os animais com diagnóstico positivo, havia casos com infecção subclínica; com lesões isoladas e regressão espontânea e com a forma sistêmica fatal. Cerca de 19% dos casos apresentaram a doença na forma linfocutânea; 35% tiveram o envolvimento dos tratos respiratório e digestivo e 39,5% dos animais apresentaram lesões cutâneas múltiplas (12, 13, 52). As lesões podem ocorrer no nariz (“nariz de palhaço”), cabeça, patas, cauda e em outras partes do corpo. Decorrentes da inoculação do fungo por lesões traumáticas, surgem pápulas e nódulos múltiplos que evoluem para úlceras que podem chegar a extensas áreas de necrose com eliminação de exsudato purulento, podendo haver também o envolvimento de tecido muscular e ósseo. Pela autohigienização com a língua, ocorre disseminação da infecção para outras áreas do corpo. Do mesmo modo, por causa do prurido, o animal costuma esfregar as patas sobre a lesão ulcerada, contaminando-a com as leveduras presentes em sua superfície. Em consequência, uma lesão poderá se desenvolver no coxim plantar e se tornar ulcerada, transformando-se numa fonte de contaminação para outras áreas do corpo do animal. Como acontece em outras espécies de animais, o *S. schenckii* invade a circulação linfática e suas células são retidas nos nódulos linfáticos. Nesses nódulos e, porque o fungo continua a se multiplicar, logo ocorre o infartamento do nódulo, seguindo-se o seu rompimento e ulceração apresentando contínua eliminação de material purulento. Pelos vasos linfáticos eferentes, as células fúngicas chegam ao nódulo seguinte e, desta maneira, os nódulos da cadeia ganglionar serão infectados resultando, assim, numa cadeia de nodulações perceptíveis visualmente ou pela palpação. Nos gatos, entretanto, este padrão de disseminação da infecção também é acompanhado pela disseminação aleatória pela língua e das patas contaminadas pelas leveduras presentes na superfície das úlceras (15) (Fig. 1).





Figura 1. Gatos com lesões ulceradas, localizadas em diversas partes do corpo.

### Coleta de Material

Considerando que o *Sporothrix schenckii* tem predileção pelo sistema linfático, o material mais adequado para ser coletado é um nódulo linfático infartado, devendo-se evitar contaminações externas. Deve ser retirado por inteiro por meio de uma incisão cirúrgica. Quando houver ulcerações, o material pode ser coletado com o auxílio de um swab estéril (Fig. 2) que deve ser friccionado na superfície da lesão, que é rica em células do fungo. Biópsias também podem ser feitas, utilizando-se de colorações como o PAS para evidenciar o fungo pela histopatologia. Quando se tratar de infecções disseminadas ou de localização específica, a forma de coleta e o tipo de material irão variar em cada caso. Assim, pode ser necessário coletar sangue, urina, secreção nasal, saliva, fluido sinovial ou líquido céfalo-raquidiano (15).





Figura 2. Material coletado na superfície de lesão ulcerada com o auxílio de swab estéril,

### Citologia/ Histopatologia

A observação microscópica do fungo no material patológico pode ser realizada em esfregaços submetidos às colorações convencionais como Gram, Giemsa, Panótico, Novo azul de metileno ou em cortes histológicos corados pelo PAS, Tricrômico de Gomori ou Metenamina prata. Em todos os casos o *Sporothrix sp* apresenta-se como leveduras ovaladas, arredondadas ou em forma de charuto, livres ou no interior de macrófagos (Fig. 3). Sua parede celular é refrátil e o citoplasma pode se retrair, dando a impressão de haver uma cápsula. Neste caso, é preciso cuidado para não confundi-lo com o *Cryptococcus neoformans*. Nas lesões ulceradas, as leveduras são encontradas em grande número, especialmente em gatos, enquanto que no homem e em outros animais como os cães e em lesões não ulceradas observa-se um número menor ou, elas podem não ser encontradas. Melhores resultados podem ser conseguidos pela imunofluorescência com a utilização de anticorpos marcados com fluoresceína ou rodamina, mas este procedimento é de aplicação limitada pela dificuldade em se encontrar os reagentes e por serem caros os equipamentos (15).

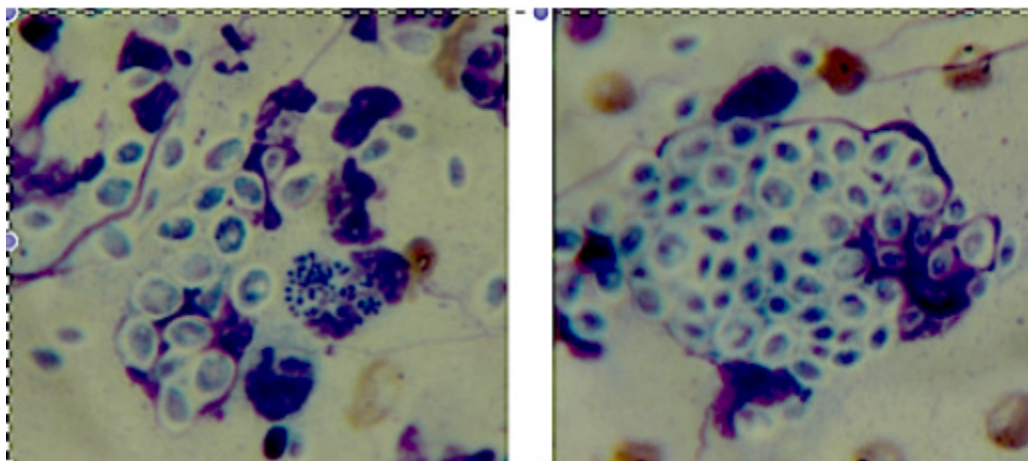


Figura 3. *Sporothrix sp* em forma de leveduras ovaladas e arredondadas, livres ou no interior de macrófagos.

### Cultivo e identificação

Com base em critérios filogenéticos foi criado o complexo *S. schenckii*, considerado um conjunto composto por seis espécies crípticas (16) que são indistinguíveis

macroscopicamente e são muito parecidas quanto às suas características microscópicas. Como a identificação genotípica das espécies demanda procedimentos pouco acessíveis aos laboratórios de rotina diagnóstica, foram definidos critérios fisiológicos e nutricionais para a distinção clássica entre as espécies (16). Quadro 1.

**Isolamento e dimorfismo** - Embora a observação de elementos fúngicos na microscopia direta de tecidos ou de fluidos possa sugerir um diagnóstico de esporotricose, a confirmação pelo isolamento e identificação da espécie é indispensável. Para isso é necessário cultivar o material suspeito em meios de cultura seletivos (acrescidos de cloranfenicol e cicloheximida) (15, 35). Como as espécies que compõem o complexo *Sporothrix schenckii* são dimórficas, o material que for coletado de lesões deverá ser semeado em dois meios de cultura diferentes: agar infusão de cérebro e coração, com incubação a 37°C e no meio de Sabouraud dextrose agar que deverá ser incubado a 25°C. Em certos casos, a conversão para a fase leveduriforme requer diversas subculturas e incubação prolongada a 37°C. Assim procedendo, o crescimento do fungo será de dois tipos:

a) **leveduriforme** nos cultivos a 37°C, característica que é semelhante à observada quando o fungo se encontra parasitando o tecido animal. Nestas condições, o crescimento terá consistência cremosa e sua cor será creme (15) e, na microscopia, suas células serão predominantemente alongadas, mas também com presença de células ovóides e arredondadas;

b) **micelial** quando a incubação tiver sido feita a 25°C. Este tipo de crescimento corresponde ao que se observa no meio ambiente na superfície de vegetais. Neste caso, o fungo crescerá formando colônia enrugada, aderente ao meio de cultura, constituída por uma película muito resistente formada por um denso entrelaçado de suas hifas, apresentando às vezes um micélio aéreo. Um dos aspectos considerados importantes para a caracterização do *S. schenckii* é a pigmentação de suas colônia que, em seu início, tem a cor creme e, depois vai escurecendo, gradativamente, até se tornar cinza, depois cinza escuro e, finalmente, negra (15) (Fig. 4). Esta pigmentação escura está associada à produção de melanina (53-55) que é universalmente reconhecida como um fator de virulência produzido por diversos fungos patogênicos.



Figura 4. Crescimento micelial em meio de Sabouraud evidenciando a pigmentação escura associada à produção de melanina.

**Morfologia microscópica** - À microscopia do crescimento micelial observa-se hifas finas septadas e pequenos conídios dematiáceos (40) produzidos em denticulações presentes em pequenas dilatações existentes nas extremidades de conidióforos ou podem ser encontrados ligados diretamente às hifas (Fig. 5). Os meios de cultura indicados para o estudo da conidiogênese são o agar batata dextrose (PDA) e o agar farinha de milho (CMA) (54) e o diâmetro das colônias é determinado em cultivos no meio PDA com incubação por 21 dias a 30°C.

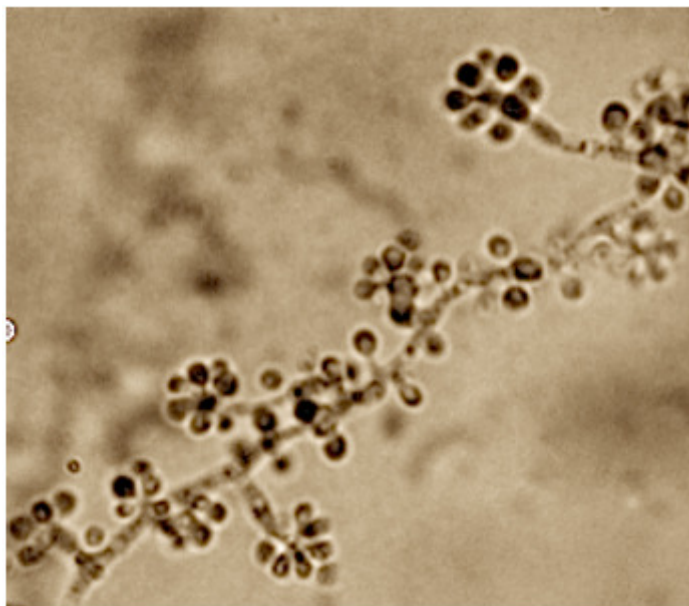


Figura 5. Microscopia de crescimento micelial evidenciando hifas finas e septadas e os conídios pigmentados.

Quadro 1. Principais diferenças morfofisiológicas entre as espécies do complexo *Sporothrix schenckii*. Adaptado de Marimon et al.(16) e Rodrigues (28).

Espécies	Conídios sésseis pigmentados	Colônias maiores que 50mm em PDA a 30°C por 21 dias	Crescimento a 37 °C	Teste de assimilação de sacarose	Teste de assimilação de rafinose
<i>S. brasiliensis</i>	Sim	Não	Sim	-	-
<i>S. luriei</i>	Não	Não	Sim	-	-
<i>S. globosa</i>	Sim	Não	Não	+	-
<i>S. mexicana</i>	Sim	Sim	Sim	+	+
<i>S. schenckii</i>	Sim	Não	Sim	+	+
<i>S. albicans</i>	Não	Sim	Sim	+	-

Chave taxonômica para a identificação das espécies do complexo *Sporothrix schenckii*. Adaptado de Marimon et al. (16, 27) e Rodrigues (28).

Não assimila sacarose: *S. brasiliensis* e *S. luriei*.

Assimila sacarose: *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. schenckii* e *S. albicans*.

Colônias com diâmetro até 30 mm aos 21 dias em PDA a 35 °C; produção de conídios sésseis e pigmentados e conídios simpodiais de 2 a 6 µm de diâmetro: *S. brasiliensis*.

Colônias com diâmetro acima de 30 mm aos 21 dias em PDA a 35 °C; ausência de conídios sésseis e pigmentados e conídios simpodiais de 4 a 10 µm de diâmetro: *S. luriei*.

Diâmetro das colônias acima de 50 mm aos 21 dias em PDA a 30 °C: *S. mexicana*, *S. albicans*.

Diâmetro das colônias abaixo de 50mm aos 21 dias em PDA a 30 °C: *S. brasiliensis*, *S. luriei*, *S. globosa*, *S. schenckii*.

Assimila rafinose; colônias com coloração marrom em duas semanas em CMA a 30°C: *S. mexicana*.

Não assimila rafinose; colônias permanecem incolores após duas semanas em em CMA a 30 °C: *S. albicans*.

Não assimila rafinose; temperatura máxima para o crescimento vegetativo é 35°C; conídios sésses pigmentados, globosos ou subglobosos: *S. globosa*.

Assimila rafinose; temperatura máxima para o crescimento vegetativo é 37 °C; conídios sésses pigmentados cuneiformes: *S. schenckii*.

### Detecção molecular

Sabe-se que os diagnósticos das micoses são demorados porque, em sua maioria, eles se baseiam no cultivo e na identificação do agente etiológico que, em geral, cresce lentamente. Por isso, de há muito tempo, os micologistas clínicos vêm buscando por novos procedimentos que permitam acelerar os lentos procedimentos laboratoriais atuais (56). Nos últimos anos têm sido introduzidos novos métodos que não se utilizam dos tradicionais procedimentos de cultivo (57), seguidos da caracterização morfológica, bioquímica, fisiológica ou sorológica, os quais podem não ser conclusivos em virtude da presença de número pequeno de células fúngicas nos materiais patológicos ou quando não é possível obter crescimento do fungo ou, ainda, pela predominância de outros micro-organismos na lesão. Nestes casos, os métodos de detecção molecular podem ser mais práticos e são mais rápidos. Até o presente momento, entretanto, foram poucas as propostas de métodos baseados em detecção molecular para o diagnóstico da esporotricose e, certamente, ainda há muito o que fazer para torná-los mais simples e baratos. Tomando por base o gene da quitina sintetase foram desenvolvidos primers de oligonucleotídicos específicos para a detecção molecular do *S. schenckii* em biópsias de pacientes (17). Tendo como alvo iniciadores específicos para a sequência do gene rRNA 18S, foi possível, pela técnica de Nested-PCR, detectar DNA genômico de *S. schenckii* em amostras coletadas de pacientes (58), tornando mais ágil o diagnóstico da esporotricose, assim como, possibilitou o esclarecimento de casos clínicos em que tanto os testes histoquímicos como a cultura foram negativos. Conjuntos de primers de oligonucleotídeos alvos para o gene da topoisomerase II foram utilizados para a identificação do *S. schenckii* pelo PCR (59). Sondas específicas de DNA foram empregadas na identificação de fungos dimórficos, incluindo o *S. schenckii*, isolados de casos clínicos pela detecção de produtos da amplificação de PCR por meio de ensaios imunoenzimáticos (60).

### Tratamento

A esporotricose responde bem ao tratamento oral com soluções saturadas de iodeto de potássio nas dosagens de 40mg/Kg para cães e de 20mg/Kg para gatos a cada 12 a 24 horas e continuando por 30 dias após o desaparecimento total dos sintomas. Em gatos, este tratamento tem sido evitado pelos veterinários porque é comum a ocorrência de iodismo, caracterizado por vômitos, anorexia, depressão, icterícia, tremores, corrimento nasal e ocular, hipotermia, insuficiência cardíaca. Nestes casos, o tratamento deve ser interrompido por uma semana, reiniciando-o com a mesma dosagem ou com dosagem mais baixa ou o iodeto pode ser substituído por cetoconazol, itraconazol ou fluocitosina. Em gatos, bons resultados têm sido obtidos com dosagens de 50mg de itraconazol por animal. Em todos os casos, o tratamento deve ser continuado por 30 dias depois de desaparecidos os sinais. O tratamento de grandes animais pode ser feito com o iodeto de potássio adicionado à ração e fornecido aos animais, inclusive de forma preventiva, quando houver casos no plantel (15).

Alguns cuidados devem ser mantidos durante o tratamento, por se tratar de uma zoonose que pode ser transmitida ao homem pelo contato com as lesões ulceradas dos animais. É muito importante que o animal seja mantido em isolamento e que se faça uso de luvas todas as vezes em que houver contato físico com o animal. Crianças, idosos, aidéticos, diabéticos e qualquer outro indivíduo que seja portador de uma doença crônica ou esteja

momentaneamente imunossuprimido, deve manter distância do animal com esporotricose. O ambiente em que o animal se encontra e os utensílios utilizados, devem ser higienizados periodicamente com substâncias antifúngicas (hipoclorito, por exemplo).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o desdobramento da espécie *Sporothrix schenckii* e a constituição de um complexo de espécies crípticas composto por seis espécies, modificaram-se os procedimentos da rotina diagnóstica da esporotricose com a necessária inclusão de novos aspectos morfológicos e nutricionais. Com esta nova conceituação torna-se necessário amplificar os estudos sobre epidemiologia e determinar as possíveis correlações de cada espécie com as várias manifestações clínicas da doença. Será, também, importante caracterizar os fatores de virulência inerentes a cada espécie e determinar a sensibilidade específica às diversas formas de tratamento disponíveis.

## REFERÊNCIAS

1. Rosa AC, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52:451-9.
2. Schenck BR. On refractory subcutaneous abscesses caused by fungus possibly related to the *Sporotricha*. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1898;9:286-90.
3. Hektoen L, Peerkins CF. Refractory sub-cutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. *J Exp Med*. 1900;5:77-90.
4. Lutz A, Splendore A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. *Rev Med*. 1907;21:433-50.
5. Fleury RN, Taborda PR, Gupta AK, Fujita MS, Rosa PS, Weckwerth AC, et al. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil. *Int J Dermatol*. 2001;40:318-22.
6. Xavier MO, Nobre MO, Sampaio Junior DP, Antunes TA, Nascente PS, Sória FAB, et al. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. *Cienc Rural*. 2004;34:1961-3.
7. Bezerra LML, Schubach AO, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc*. 2006;78:293-308.
8. Barros MBL, Schubach TMP, Galhardo MCG, Schubach AO, Monteiro PCF, Reis RS, et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96:777-9.
9. Barros MBL, Schubach AO, Valle AC, Galhardo MCG, Conceição-Silva FC, Schubach TMP, et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis*. 2004;38:529-35.
10. Barros MBL, Schubach AO, Schubach TMP, Wanke B, Passos SRL. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect*. 2008;136:1192-6.



11. Barros MBL, Schubach TMP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach AO. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Rev Panam Salud Publica*. 2010;27:455-60.
12. Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Barros MBL, Figueiredo F, Cuzzi T, et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J Am Vet Med Assoc*. 2004;224:1623-9.
13. Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Barros MBL, Figueiredo FB, Cuzzi T, et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Med Mycol*. 2006;44:87-92.
14. Schubach AO, Barros MBL, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21:129-33.
15. Cruz LCH. *Micologia veterinária*. Rio de Janeiro: Revinter; 2010.
16. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3198-206.
17. Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. *Mycoses*. 2001;44:261-5.
18. Marimon R, Gene J, Cano J, Trilles L, Lazera MS, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3251-6.
19. Kano R, Sano A, Makimura K, Watanabe S, Nishimura K, Yamaguchi H, et al. A new genotype of *Arthroderma benhamiae*. *Med Mycol*. 2008;46:739-44.
20. Camargo ZP. *Imunofluorescência na esporotricose [dissertação]*. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 1974.
21. Tateishi T, Murayama SY, Otsuka F, Yamaguchi H. Karyotyping by PFGE of clinical isolates of *Sporothrix schenckii*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996;13:147-54.
22. Takeda Y, Kawasaki M, Ishizaki H. Phylogeny and molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* in Japan. *Mycopathologia*. 1991;116:9-14.
23. Ishizaki H, Kawasaki M, Anzawa K, Mochizuki T, Chakrabarti A, Ungpakorn R, et al. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in India, Thailand, Brazil, Colombia, Guatemala and Mexico. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2009;50:19-26.
24. Balajee SA, Sigler L, Brandt ME. DNA and the classical way: Identification of medically important molds in the 21st century. *Med Mycol*. 2007;45:475-90.
25. Ishizaki H, Kawasaki M, Aoki M, Wu S, Lin J, Kim JA, et al. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* from China, Korea and Spain. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2004;45:23-5.
26. Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MR, Perez-Mejia A, Navarro-Barranco H, Souza V, Zuniga G, et al. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according

- to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:3004-11.
27. Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med Mycol.* 2008;46:621-5.
  28. Rodrigues AM. Taxonomia polifásica e características proteômicas do complexo *Sporothrix schenckii* [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2010.
  29. Oliveira MM, Paes RA, Muniz MM, Galhardo MCG, Oliveira RMZ. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia.* 2011;172:257-67.
  30. Mackinnon JE. The effect of temperature on the deep mycoses. In: Wolstenholme GEW, Porter R, editors. *A Ciba Foundation Symposium - systemic mycoses.* London: J & A Churchill; 1968. p.164-78.
  31. Criseo G, Romeo O. Ribossomal DNA sequencing and phylogenetic analysis of environmental *Sporothrix schenckii* strains: comparison with clinical isolates. *Mycopathologia.* 2010;169:351-8.
  32. Mackinnon JE, Conti-Diaz IA, Gezuela E, Civila E, Luz S. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature considerations on its pathogenicity and ecology. *Sabouraudia.* 1969;7:38-45.
  33. Noriega CT, Garay RR, Sabanero G, Basurto RT, López MS. *Sporothrix schenckii*: culturas en diferentes suelos. *Rev Latinoam Micol.* 1993;35:191-4.
  34. Thompson DW, Kaplan AW. Laboratory-acquired sporotrichosis. *Sabouraudia.* 1977; 15:167-70.
  35. Kwon-Chung KJ, Bennet JE. *Medical mycology.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1992.
  36. Read SI, Sperling LC. Feline sporotrichosis. Transmission to man. *Arch Dermatol.* 1982; 118:429-31.
  37. Dunstan RW, Reimann KA, Langham RF. Feline sporotrichosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;189:880-3.
  38. Marques S, Franco S, Camargo RM, Dias LD, Haddad Jr V, Fabris VE. Sporotrichosis of the domestic cat (*Felis catus*): human transmission. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1993;35:327-30.
  39. Bustamante B, Campos PE. Endemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2001; 14:145-9.
  40. Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME, et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:1106-13.
  41. Findlay GH. The epidemiology of sporotrichosis in the Transvall. *Sabouraudia.* 1970;7: 231-6.

42. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of sporotrichosis in seedling handlers. *Morb Mortal Wkly Rep.* 1988;37:652-3.
43. Galhardo MCG. Esporotricose zoonótica no Rio de Janeiro ainda sem controle. *Bol Inf Soc Infectol.* 2011;34:3-5.
44. Kauffman CA. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis.* 1999;29:231-7.
45. Schubach TMP, Valle ACF, Galhardo MCG, Monteiro PCF, Reis RS, Oliveira RMZ, et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol.* 2001;39:147-9.
46. Reis RS, Paes RA, Muniz MM, Tavares PM, Monteiro PC, Schubach TM, et al. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:769-74.
47. Barros MBL, Schubach AO, Galhardo MC, Schubach TMP, dos Reis RS, Conceição MJ, et al. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol.* 2003;42:677-81.
48. Barros MBL, Costa DL, Schubach TMP, do Vale AC, Lorenzi NP, Teixeira JL, et al. Endemic of zoonotic sporotrichosis: profile of cases in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:246-50.
49. Singer JI, Muncie JE. Sporotrichosis. Etiologic considerations and report of additional cases from New York. *N Y State J Med.* 1952;52:2147-53.
50. Cruz LCH, Rosa CAR, Baffa MC, Campos SG. Isolamento do *Sporothrix schenckii* de gatos com lesões ulcerativas. In: *Anais do 12º Congresso Brasileiro de Microbiologia e 9º Congresso Latino-Americano de Microbiologia; 1983, São Paulo. São Paulo: Associação Latino Americana de Microbiologia; Sociedade Brasileira de Microbiologia; 1983.*
51. Schubach TMP, Schubach AO, Reis RS, Cuzzi-Maya T, Blanco TC, Monteiro DF, et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia.* 2002;153:83-6.
52. Barros MBL, Paes RA, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24:633-54.
53. Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun.* 2000;68:3696-703.
54. Madrid IM, Xavier MO, Mattei AS, Fernandes CG, Guim TN, Santin R, et al. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes Infect.* 2010;12:162-5.
55. Teixeira PA, de Castro RA, Ferreira FR, Cunha MM, Torres AP, Penha CV, et al. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. *Med Mycol.* 2010;48:687-95.
56. Reiss E, Obayashi T, Orle K, Yoshida M, Zancope-Oliveira RM. Non-culture based

- diagnostic tests for mycotic infections. *Med Mycol.* 2000;38 Suppl 1:147-59.
57. Stevens DA. Diagnosis of fungal infections: current status. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49 Suppl 1:11-9.
58. Hu S, Chung WH, Hung SI, Ho HC, Wang ZW, Chen CH, et al. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a Nested PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2003;44:1414-8.
59. Kanbe T, Natsume L, Goto I, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H, et al. Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene. *J Dermatol Sci.* 2005;38:99-106.
60. Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, Morrison CJ. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3505-11.

**Recebido em: 07/12/12**

**Aceito em: 15/01/13**

## CLOSTRIDIOSES DOS ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Francisco Carlos Faria Lobato<sup>1</sup>  
Felipe Masiero Salvarani<sup>1</sup>  
Luciana Aramuni Gonçalves<sup>1</sup>  
Prhiscylla Sadanã Pires<sup>1</sup>  
Rodrigo Otávio Silveira Silva<sup>1</sup>  
Guilherme Guerra Alves<sup>1</sup>  
Monique Neves<sup>1</sup>  
Carlos Augusto de Oliveira Júnior<sup>1</sup>  
Pedro Lúcio Lithg Pereira<sup>1</sup>

### RESUMO

As bactérias do gênero *Clostridium* são bastonetes, Gram-positivos e anaeróbios. Devido à alta capacidade de esporulação da maioria das bactérias patogênicas desse grupo, as infecções e intoxicações causadas pelo gênero *Clostridium*, conhecidas por clostridioses, são de difícil erradicação e estão entre as principais enfermidades dos animais domésticos em todo mundo, principalmente de ruminantes. Esta revisão tem como objetivo abordar as principais clostridioses que acometem os animais domésticos no Brasil, abordando os principais aspectos e ocorrência do botulismo, tétano, mionecroses (gangrena gasosa e carbúnculo sintomático), doenças causadas por *C. perfringens* e diarreias e colites causadas por *C. difficile*.

**Palavras-chave:** diarreia, mionecrose, enterotoxemia, botulismo, tétano.

## CLOSTRIDIAL INFECTION IN FARM ANIMALS

### ABSTRACT

Bacteria from genus *Clostridium* are rod, Gram-positive and anaerobic bacteria. Clostridial infections are considered one of the most important group of diseases of domestic animals, mainly in ruminants. Most pathogenic clostridial species are able to sporulate and has a marked dissemination in the environment, making infections and poisoning by these bacteria virtually impossible to eradicate. The aim of this review is to describe main clostridial diseases from domestic animals in Brazil, focusing in main features and occurrence of botulism, tetanus, myonecrosis (gas gangrene and blackleg), diseases by *C. perfringens* and diarrhea and colitis caused by *C. difficile*.

**Keywords:** diarrhea, myonecrosis, enterotoxemia botulism, tetanus.

## ENFERMEZAS CLOSTRIDIALES DE ANIMALES DE GRANJA

### RESUMEN

Las bacterias del género *Clostridium* son bastonetes, Gram positivos, anaeróbicos. Debido a la alta capacidad de esporulación de la mayoría de microorganismos pertenecientes a este grupo, las infecciones e intoxicaciones por bacterias del género *Clostridium*, conocidas como

---

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 567, campus Pampulha da UFMG, 30123-970. Belo Horizonte, MG flobato@vet.ufmg.br

clostridiosis, son difícil de erradicar y se encuentran entre las principales enfermedades que afectan los animales domésticos en todo el mundo, principalmente en rumiantes. Esta revisión tiene como objetivo abordar las principales clostridiosis que afectan los animales domésticos en Brasil, enfocando aspectos básicos y ocurrencia de botulismo, tétano, mionecrosis (gangrena gaseosa y carbunco sintomático), enfermedades causadas por *C. perfringens*, diarreas y colitis por *C. difficile*.

**Palabras clave:** diarrea, mionecrosis, enterotoxemia, botulismo, tétanos.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Clostridium* foi primeiramente descrito por A. Prazmowski em 1880 e desde então foram identificadas mais de 225 espécies distribuídas em áreas geográficas distintas. *Clostridium* spp. são bastonetes Gram-positivo, esporulados e anaeróbios estritos, sendo a maioria constituinte da microbiota intestinal de animais e seres humanos, porém apenas algumas espécies são capazes de causar enfermidades nos animais.

Muitos dos processos infecciosos e intoxicações que afetam os animais domésticos são causados por bactérias do gênero *Clostridium*. Estas doenças são chamadas de clostridioses, e possuem altas taxas de letalidade. Devido à alta capacidade de esporulação, as bactérias desse gênero são capazes de se manter potencialmente infectantes no solo por longos períodos, representando um risco significativo para a população animal e humana. Mesmo sendo capazes de produzir doença em animais e seres humanos, são raramente considerados agentes zoonóticos.

As bactérias patogênicas que compõem este gênero causam doenças basicamente por dois mecanismos: produção de toxinas e invasão de tecidos. Os clostrídios penetram no organismo na forma esporulada, por meio de alimento contaminado, feridas ou por inalação. As toxinas são produzidas no organismo do animal ou são ingeridas pré-formadas.

Dentre as toxinas de origem clostridial, destacam-se as neurotoxinas botulínicas, tetânica e a toxina épsilon produzida por *C. perfringens* tipo B e D, como as mais potentes toxinas de origem microbiana conhecidas.

As clostridioses estão entre as principais enfermidades que acometem os animais domésticos no país com altas taxas de morbidade e letalidade, acarretando grandes prejuízos econômicos ao setor produtivo.

Os principais agentes envolvidos e as enfermidades causadas pelas bactérias do gênero *Clostridium* são apresentadas no quadro 1.

Quadro 1: Principais doenças clostridiais e seus agentes causadores

	DOENÇA	AGENTE CAUSADOR
Doenças Neurotrópicas	Tétano	<i>Clostridium tetani</i>
	Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i>
Doenças Hepáticas	Hepatite necrótica Hemoglobinúria bacilar	<i>Clostridium novyi</i> tipo B <i>Clostridium haemolyticum</i>
Doenças causadas por <i>Clostridium perfringens</i>	Enterotoxemia dos Bovinos Adultos Doença do Rim Pulposo Enterotoxemia Hemorrágica	<i>Clostridium perfringens</i> tipos A, B, C, D e E
Mionecroses	Carbúnculo sintomático Gangrena gasosa ou edema maligno	<i>Clostridium chauvoei</i> <i>Clostridium septicum</i> <i>Clostridium sordellii</i> <i>Clostridium novyi</i> tipo A <i>Clostridium perfringens</i> tipo A
Diarreias	Colite pseudomembranosa	<i>Clostridium difficile</i>

Esta revisão abrange as principais clostridioses que acometem os animais de produção no Brasil.

## CLOSTRIDIOSES

### DOENÇAS CAUSADAS POR *Clostridium perfringens*

As afecções causadas por *C. perfringens* ocorrem sob condições específicas e na presença de determinados fatores predisponentes. Como consequência, ocorre a multiplicação do agente no trato gastrointestinal dos animais e produção de exotoxinas, principais responsáveis pelo desenvolvimento do quadro nosológico. *C. perfringens* é classificado em cinco tipos (A-E), com base na produção de quatro toxinas principais, alfa, beta, épsilon e iota (quadro 2) (1).

Quadro 2: Caracterização das toxinas alfa, beta, épsilon e iota de *C. perfringens*

	Toxina alfa	Toxina beta	Toxina épsilon	Toxina iota
Codificação	Gene <i>plc</i>	Gene <i>cpb</i>	Gene <i>etx</i>	Genes <i>iap</i> e <i>iab</i>
Origem	Cromossomal	Plasmidial	Plasmidial	Plasmidial
Peso molecular (kDa)	43	40	33,7	47,5 e 105
Efeito principal	Hemólise intravascular, danos capilares e agregação plaquetária.	Formação de poros e alteração na permeabilidade vascular.	Alteração na permeabilidade vascular.	Alteração na organização do citoesqueleto celular.

### *Clostridium perfringens* tipo A

*Clostridium perfringens* tipo A tem sido isolado do intestino de diversas espécies de animais, sendo considerado componente da microbiota normal. Evidências sugerem seu envolvimento na diarreia em leitões lactentes, enterite necrótica em aves e doença do “cordeiro amarelo” em ovinos (2).

Em suínos, a infecção acontece em leitões lactentes com um a quatro dias de vida, que se infectam logo após o nascimento com os esporos presentes no ambiente e nas fezes das porcas. Em um estudo retrospectivo realizado nos Estados Unidos da América, nos anos de 2005 e 2006, *C. perfringens* tipo A foi identificado como o principal agente causador de diarreia neonatal, compreendendo 48% das 273 amostras analisadas (3). No Brasil existem apenas duas publicações relatando o envolvimento deste agente como causador de diarreia neonatal suína, em 2003, por Moreno et al. (4), que isolaram *C. perfringens* tipo A, beta-2 positivo, de leitões de um a cinco dias de idade, de quatro surtos de diarreia neonatal na região Sul do país. E em 2004, Costa et al. (5) isolaram o agente em três rebanhos de granjas comerciais dos estados de Minas Gerais e São Paulo. A patogenia da infecção envolve a participação da toxina alfa, entretanto existem relatos, que atribuem à toxina beta-2 e não a toxina alfa, como a responsável pela ocorrência de diarreia (6). Os sinais clínicos consistem em diarreia mucóide e pastosa, de coloração amarelada e não hemorrágica, apatia, desidratação e baixa taxa de crescimento. À necropsia, pode ser encontrada hiperemia discreta a moderada da mucosa intestinal e dilatação de alças intestinais devido à produção aumentada de gases e excesso de conteúdo líquido (5). Em geral, as lesões não são muito graves, sejam elas macro ou microscópicas permitindo sugerir que a diarreia que acompanha estes quadros seja do tipo secretória (3).

A enterite necrótica afeta tanto frangos de corte quanto aves silvestres, e, atualmente, além da ação da toxina alfa, tem sido proposto o envolvimento da toxina NetB (7). Diversos fatores predisponentes são conhecidos hoje, entre eles, a ocorrência de doenças concomitantes como coccidiose, o tipo de dieta, estresse e elevada densidade animal. Em granjas comerciais, afeta principalmente animais jovens, entre duas e cinco semanas de idade, e pode ocorrer de maneira aguda ou branda, com mortalidade de até 50%, entretanto, a doença ocorre mais comumente na forma branda, na qual as aves apresentam sinais clínicos inespecíficos com queda no desempenho zootécnico, traduzida por uma taxa de crescimento reduzida e a desuniformidade do lote (8).

A doença do “cordeiro amarelo” é uma enterotoxemia também causada pela ação da toxina alfa e tem sua patogenia baseada na hemólise de eritrócitos com a liberação de hemoglobina. Os animais acometidos apresentam depressão, anemia, icterícia e hemoglobinúria. O curso clínico da doença é de seis a 12 horas, podendo o animal vir a óbito. Uma condição semelhante é descrita em caprinos e bezerros (2).

### ***Clostridium perfringens* tipo B**

É o agente causador da disenteria em cordeiros recém nascidos, podendo afetar também caprinos, bezerros e potros. Esta afecção acomete cordeiros com menos de duas semanas de idade e é causada principalmente pela ação da toxina beta, que é inativada por enzimas proteolíticas, como a tripsina. O fato de a doença ocorrer primariamente em animais recém nascidos advém do excesso de colostragem, por ser o colostro fonte de fatores antitripsínicos, favorecendo assim a ação da toxina. A doença apresenta morbidade em torno de 30%, com letalidade podendo atingir 100% dos animais acometidos. O curso é superagudo, em geral em poucas horas os animais apresentam fortes dores abdominais, redução na sucção do colostro e/ou leite, fezes semifluidas e coradas de vermelho, além de desenvolverem o quadro de enterite, com extensa hemorragia e ulceração do intestino delgado (9).

### ***Clostridium perfringens* tipo C**

Agente primário de enterites necróticas hemorrágicas em leitões com até sete dias de vida, podendo ocorrer de forma precoce, afetando animais com menos de 12 horas de vida. Ao contrário do *C. perfringens* tipo A, o tipo C é encontrado em menor frequência e



quantidade no intestino de animais saudáveis. O agente pode ser transmitido na forma vegetativa de leitões para leitões ou por meio de esporos presentes nas fezes das mães. Em estudos de prevalência Yaeger, Funk e Hoffman (10) diagnosticaram em 100 leitões que apresentavam diarreia com até 10 dias de vida, 2% de *C. perfringens* tipo C como único agente. No Brasil não há trabalhos de prevalência deste agente.

Na forma superaguda os sinais clínicos aparecem entre 12 a 24 horas após o nascimento do leitão, e a morte em até 24 horas. São observadas diarreia hemorrágica com consistência aquosa e severa desidratação. Nos casos agudos, pode-se observar diarreia hemorrágica, com presença de restos necróticos, sinais de dor abdominal, desidratação, apatia e a morte podendo ocorrer por obstrução intestinal ou toxemia. A forma crônica é bem menos frequente, as fezes apresentam coloração amarelada a esbranquiçada, sendo facilmente confundida com as diarreias causadas por outros enteropatógenos (11). À necropsia, as lesões estão comumente restritas ao intestino delgado e podem ser vistos variados graus de hiperemia do mesentério, enterite fibrinonecrotica e conteúdo intestinal sanguinolento. Microscopicamente, as lesões são de necrose profunda da mucosa do intestino delgado, podendo se estender até o ceco e porções do cólon, com hemorragia na lâmina própria, submucosa e camadas musculares (12).

*Clostridium perfringens* tipo C também é descrito como agente da enterite hemorrágica em ovinos recém-nascidos, determinando um quadro clínico e patológico muito semelhante ao produzido pelo *Clostridium perfringens* tipo B. Ainda é responsável por um quadro superagudo em ovinos adultos denominado de “Struck”, que se caracteriza por morte súbita (2).

### ***Clostridium perfringens* tipo D**

Agente da enterotoxemia comumente denominada de doença da superalimentação ou do rim pulposo. Enfermidade de distribuição mundial, que afeta primariamente ovinos de qualquer idade com exceção dos recém nascidos, e em menor frequência caprinos e bovinos. No Brasil existem relatos da doença nas três espécies mencionadas (13-15). Alterações na microbiota rumenal em decorrência de mudanças bruscas na alimentação, fornecimento de dietas ricas em carboidratos e pobre em fibras, dentre outros fatores, levam a multiplicação do agente em proporções logarítmicas, produzindo grandes quantidades da toxina épsilon, na forma de protoxina, sendo convertida em uma proteína letal pela ação da tripsina digestiva ou por toxinas secundárias do *C. perfringens*. A toxina ativada atua sobre o epitélio intestinal, causando aumento da permeabilidade vascular, e, ao atingir a circulação sanguínea, atinge órgãos como cérebro, rins, pulmões, fígado e coração, onde se liga a receptores específicos nas células endoteliais, levando a uma degeneração dessas células. Com aumento da permeabilidade vascular, ocorre extravasamento de líquidos e proteínas para o espaço perivascular, com conseqüente edema. Quando ocorre no tecido cerebral é denominado edema perivascular proteináceo eosinofílico ou microangiopatia (16).

Em condições naturais e na maioria dos casos, a morte dos animais ocorre durante as primeiras seis a 18 horas, mas se sobrevivem por mais de 36 a 48 horas, ocorre necrose do tecido cerebral, conhecida como encefalomalácia focal simétrica (17). A forma clínica mais frequente é a superaguda, com morte entre quatro a oito horas, podendo ser observadas alterações neurológicas como opistótono e movimentos de pedalagem; e alterações respiratórias como taquipnéia e edema pulmonar. Caprinos também podem apresentar essas três formas da doença, porém as lesões neurológicas são pouco frequentes, observando-se principalmente lesões entéricas, como diarreias e enterocolites, sendo as lesões neurológicas restritas a achados histopatológicos de edema perivascular proteináceo eosinofílico ou microangiopatia. À necropsia, os achados podem ser pouco evidentes, mas em alguns casos encontram-se hidrotórax, hidropericárdio, hidroperitônio, edema pulmonar e hérnia do

cerebelo (16). Em caprinos, além das alterações anteriormente descritas, observam-se quadros de enterocolites, hemorragias da serosa do cólon, e edema dos linfonodos mesentéricos (13).

### ***Clostridium perfringens* tipo E**

Produz enterotoxemia em cordeiros, bezerros e coelhos. Sua patogenia está envolvida com a produção da toxina iota, que precisa ser ativada por enzimas proteolíticas para promover a sua atividade biológica, causando citólise. O quadro clínico envolve diarreia hemorrágica com morte do animal em poucas horas. A necropsia observam-se áreas de hemorragia e edema na mucosa intestinal, podendo atingir a mucosa do abomaso (9).

### **Diagnóstico**

O diagnóstico confirmatório está na dependência direta da detecção da(s) toxina(s) produzida pelos agentes, diretamente no conteúdo intestinal. O método convencional para detecção destas toxinas é o teste de soroneutralização em camundongos. Também existem diferentes técnicas de PCR que, apesar de não detectarem diretamente a(s) toxina(s) produzida(s) pelos *C. perfringens* dos tipos A-E, e sim os genes que codificam a produção das mesmas, permitem a tipificação do *C. perfringens* envolvido em um determinado caso ou surto (18). Apesar da presença de toxinas no conteúdo intestinal ser o mais importante indicador das enterotoxemias, é necessário combinar este achado com outros, especialmente o histórico do animal e da propriedade, sinais clínicos, achados de necropsia e histopatologia dos órgãos com lesões (2).

### **Controle**

As medidas de controle visam o manejo correto de higiene, desinfecção do ambiente e vacinações sistemáticas de todo o rebanho, já que os animais estão em permanente contato com os agentes e com os fatores que poderão desencadear as doenças. Nas doenças que afetam animais jovens, a vacinação das fêmeas, no intuito de transferir imunidade passiva à progênie, é a principal estratégia. Nos animais acima de quatro meses de idade recomenda-se a primovacinação, com uma dose reforço quatro a seis semanas após e revacinação anual. Entretanto, a inexistência de vacinas específicas no mercado brasileiro, principalmente para aves e suínos, obriga a utilização cada vez mais precoce de antimicrobianos (9).

## **DIARRÉIA POR *Clostridium difficile***

### **Histórico**

Apesar de *C. difficile* ter sido isolado pela primeira vez em humanos em 1935, a infecção por este agente em animais domésticos, principalmente suínos e equinos, só foi relatada pela primeira vez na década de 80. Em poucos anos, este micro-organismo ganhou notoriedade como agente de afecções entéricas nestas duas espécies, sendo hoje considerado a principal causa não controlada de diarreia em leitões na Europa e Estados Unidos (19).

### **Etiopatogenia**

A infecção por *C. difficile* inicia-se pela transmissão fecal-oral de esporos eliminados por animais infectados ou portadores saudáveis. Em geral, a microbiota intestinal impede o estabelecimento do agente, sendo que a infecção ocorre na ausência de uma microbiota capaz de inibir a colonização pelo micro-organismo. Dessa forma, comumente *C. difficile* coloniza o

intestino após uma depleção dos micro-organismos intestinais causada pela antibioticoterapia, ou previamente ao estabelecimento completo da microbiota, como ocorre em leitões nas primeiras horas de vida (20). Após a colonização, estirpes de *C. difficile* produzem as toxinas A e B, ambas capazes de causar desorganização do citoesqueleto, comprometendo assim as junções celulares, e causando também arredondamento celular e apoptose. Com a lesão do epitélio intestinal, as toxinas podem ganhar a circulação sistêmica, levando a uma intensa migração leucocitária intestinal e agindo também a distância no organismo (21).

## A doença

As infecções por *C. difficile* (ICD) em suínos acometem principalmente leitões com até sete dias de idade, ocorrendo contaminação dos neonatos por esporos eliminados pela porca, seguido da colonização logo nas primeiras horas de vida (22). A ICD nesta espécie é caracterizada pelo baixo desenvolvimento corporal, colite e edema de mesocólon, sendo que apenas parte dos animais infectados apresentam diarreia. Dessa forma, é importante ressaltar que a simples ausência de conteúdo diarreico no cólon não descarta a possibilidade de infecção, sendo a doença comumente subclínica em suínos. Outro aspecto relevante da ICD em suínos é a possibilidade de participação em outras comorbidades entéricas, como a infecção por rotavírus, *C. perfringens* ou *E. coli* (23).

No Brasil, levantamentos recentes sugerem uma alta prevalência da doença no Rio Grande do Sul e Minas Gerais (19, 20). Neste último, observou-se que mais da metade das granjas avaliadas possuíam a doença no plantel, sugerindo uma grande disseminação da ICD (24). Além disso, em um estudo de diagnóstico diferencial dos principais enteropatógenos em leitões na maternidade (rotavírus, *Escherichia coli* enterotoxigenica, *Isospora suis*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*), foram encontradas as toxinas A/B e/ou lesões histológicas características do agente em aproximadamente 50% dos animais. Esses resultados sugerem uma queda na prevalência dos agentes clássicos causadores de diarreia e uma crescente importância de *C. difficile* como patógeno entérico, confirmando a infecção por este agente como uma das principais causas de diarreia neonatal em suínos na atualidade.

Em equinos, a infecção por *C. difficile* acomete potros entre um dia e cinco meses de idade, sendo caracterizada por uma diarreia profusa, desidratação, e presença de gás no intestino grosso (25). A ICD pode ocorrer de forma espontânea ou devido a utilização prévia de antimicrobianos, sendo que os mais comumente relacionados ao desenvolvimento da ICD em equinos incluem principalmente as cefalosporinas, os aminoglicosídeos e os betalactâmicos em geral (25-27).

Trabalhos sobre ICD em potros no Brasil limitam-se a duas descrições de diagnóstico (26, 27), sendo que a prevalência da doença nesta espécie permanece obscura no país. Em ambos os relatos descritos até o momento, houve uma suspeita inicial de salmonelose, havendo agravamento dos sinais clínicos devido à antibioticoterapia incorreta. Estes trabalhos confirmaram a ocorrência da doença em equinos no país e demonstram a necessidade de diagnóstico diferencial para as diarreias em potros, principalmente quando o início dos sinais clínicos ocorreram poucos dias após antibioticoterapia ou em casos onde antimicrobianos comumente utilizados para outras causas de diarreia, como salmonelose por exemplo, não resultam em melhora clínica significativa.

Em equinos adultos, *C. difficile* tem sido relatado como um agente nosocomial causador de diarreia aguda ou cólica durante a internação e após a antibioticoterapia prévia para alguma outra doença (25). Porém, até o presente momento inexistem relatos de infecção por *C. difficile* em equinos adultos no Brasil.

Além da importância direta em medicina veterinária, deve-se destacar ainda que a ICD em animais domésticos tem sido foco de estudos devido a hipótese da ICD em humanos ser uma zoonose. Essa questão surgiu após a demonstração de que estirpes de *C. difficile* isoladas

de produtos cárneos e de animais domésticos possuam grande semelhança genética com estirpes de humanos com ICD (28). Mais estudos são necessários para confirmar a hipótese de *C. difficile* como agente zoonótico, porém, se confirmada tal suspeita, a prevenção da doença em animais domésticos poderá passar a ser uma prioridade (24).

## Diagnóstico

A detecção da presença das toxinas A/B pela visualização do efeito citopático em cultura celular é considerado, pela maioria dos pesquisadores, como o método “padrão-ouro” para o diagnóstico de infecções causadas por *C. difficile*. Tal técnica tem como vantagem a alta sensibilidade e especificidade. Porém, o resultado é demorado e permite processar apenas poucas amostras por vez. Além disso, a manutenção de linhagens celulares é outro ponto desfavorável pelo alto custo e necessidade de pessoal treinado (29, 30).

Outra opção para detecção das toxinas A/B são os kits comerciais de ELISA, de fácil execução e resultado rápido. Deve-se enfatizar, porém, que todos os kits presentes no mercado até o momento foram padronizados para a detecção das toxinas A/B a partir de fezes de humanos, fazendo com que a sensibilidade e especificidade sejam extremamente variáveis quando aplicados a espécimes clínicos de animais.

Trabalhos avaliando o desempenho de kits para detecção das toxinas A/B em espécimes suínos sugerem que tais produtos apresentam sensibilidade ou especificidade baixas (31). Já para equinos, apenas um kit foi avaliado até o momento e sua performance foi considerada adequada (32). Deve-se destacar, porém, que não existem estudos avaliando os kits comerciais presentes no mercado brasileiro frente a amostras de fezes de suínos e equinos, dificultando o diagnóstico das infecções por *C. difficile* nessas espécies no país.

Além da detecção das toxinas A/B, o isolamento também tem sido utilizado como diagnóstico presuntivo, desde que seguido de confirmação da toxigenicidade do isolado. A confirmação da toxigenicidade comumente é realizada pela detecção dos genes das toxinas A (*tcdA*) e toxina B (*tcdB*) (30). Deve-se destacar, porém, que *C. difficile* pode ser um habitante normal da microbiota intestinal, e apenas o isolamento não confirma a doença (24).

Outra opção relatada para o diagnóstico, ainda pouco utilizada no Brasil, são os kits comerciais de PCR em tempo real (rPCR). Inexistem estudos avaliando a rPCR em amostras de equinos, mas relatos sugerem que a rPCR apresenta grande sensibilidade para humanos e suínos (31). Até o presente momento, a proposta seria a utilização da rPCR como um primeiro teste de triagem, sendo resultados positivos confirmados por CTA, isolamento ou kits comerciais de ELISA de alta especificidade (31, 32). Um grande entrave para utilização da rPCR para diagnóstico de ICD em animais é o custo, que é ainda mais elevado que das outras técnicas de diagnóstico.

## Controle e Tratamento

O controle das infecções por *C. difficile* nas espécies domésticas é baseado em medidas gerais de manejo, uma vez que inexistem vacinas disponíveis no mercado brasileiro até o momento. Deve-se enfatizar ainda que o agente é um grande contaminante ambiental, sendo o uso correto de produtos contendo cloro ativo e a higienização das mãos duas estratégias de extrema importância principalmente em hospitais veterinários (25). Vale lembrar que a aplicação de álcool gel nas mãos para eliminação dos esporos desse micro-organismo é ineficiente (33).

Inexistem trabalhos sobre a sensibilidade antimicrobiana de estirpes de *C. difficile* isoladas de animais domésticos no Brasil. Estudos com estirpes de *C. difficile* isoladas de suínos nos EUA sugerem que tiamulina, virginiamicina e tilosina, incluídos na alimentação dos animais podem ser úteis na profilaxia ou terapia (34). Já em equinos, além da terapêutica

básica de suporte de animais diarreicos, preconiza-se a imediata substituição do antibiótico que culminou com a infecção por metronidazol, primeira escolha, ou vancomicina (25).

## TÉTANO

### Etiopatogenia

O tétano é uma doença infecciosa não contagiosa causada pela ação das exotoxinas produzidas pelo *Clostridium tetani*, as quais provocam alterações funcionais no sistema nervoso central com aumento da excitabilidade. *C. tetani* é cosmopolita sendo comumente encontrado no solo sob a forma de esporos e trato intestinal do homem e animais domésticos (1, 9). A infecção ocorre geralmente pela contaminação por esporos na pele ou mucosa com lesões superficiais ou profundas de qualquer natureza. O corte e cura de umbigo de maneira inadequada é uma potencial porta de entrada aos esporos de *C. tetani* em grandes animais. Fatores como presença de tecidos desvitalizados, corpo estranho, isquemia e infecção contribuem para a diminuição do potencial de oxirredução na lesão o que favorece a germinação dos esporos que se multiplicam e produzem as toxinas tetanolisina e tetanospasmina, sendo a última responsável pelas características clínicas do tétano.

A tetanospasmina é uma potente neurotoxina codificada pelo gene *TeTx* de origem plasmidial não conjugativo. É produzida durante a fase estacionária de crescimento como um polipeptídeo de peso molecular de 150KDa composta de uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC) ligadas por meio de uma ligação dissulfeto. A HC apresenta o domínio de ligação em sua região C-terminal capaz de reconhecer receptores específicos nas terminações pré-sinápticas do sistema nervoso central. A toxina é internalizada e transportada em endossomos até o corpo celular do neurônio motor, localizado na medula espinhal. Em seguida, ocorre a acidificação do endossomo o que resulta em uma alteração conformacional no domínio N-terminal da HC, seguida por sua inserção na membrana do endossomo e passagem da LC para o citosol da célula. Uma vez no citosol, a LC é capaz de clivar proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) responsáveis pela exocitose em neurônios. Com isso, ocorre redução da liberação de neurotransmissores inibitórios como o ácido gama globulínico (GABA) e a glicina resultando em um quadro de paralisia espástica (35).

A tetanolisina é uma hemolisina capaz de provocar lise celular por meio da formação de poros por hidrólise dos fosfolípidos da membrana plasmática (36). O significado clínico desta enzima é desconhecido, entretanto, a mesma é inibida pelo oxigênio e colesterol plasmáticos.

Dentre os animais domésticos, os equinos apresentam maior sensibilidade à neurotoxina de *C. tetani* enquanto que os ovinos e caprinos possuem menor sensibilidade (9, 37). Os gatos apresentam uma suscetibilidade de 7200 vezes menor para desenvolver a doença quando comparados aos equinos (38). O período de incubação é variável, mas comumente é de 1 a 3 semanas (9, 37) e apresenta relação inversa com a gravidade e o prognóstico da doença.

### A doença

Clinicamente, a doença manifesta-se com febre baixa ou ausente e hipertonia muscular, ocasionando trismo mandibular, rigidez da nuca, protrusão de terceira pálpebra, disfagia, hiperextensão de membros, opistótono e insuficiência respiratória. A espasticidade da musculatura facial (riso sardônico) comumente observada em humanos já foi descrito em cães e gatos. Inicialmente, os espasmos e contraturas paroxísticas são provocados por estímulos

táceis, sonoros, luminosos ou alta temperatura ambiente e, com a evolução da doença podem ser desencadeados espontaneamente. Em geral, o animal se mantém consciente (37).

## Diagnóstico

O diagnóstico do tétano é baseado no histórico, anamnese e sinais clínicos, não dependendo de confirmação laboratorial. À necropsia, não são encontradas lesões significativas (39) e a presença de porta de entrada para o agente nem sempre é observada como em alguns relatos de surtos de tétano idiopático em bovinos jovens (37). É importante o diagnóstico diferencial para intoxicação por metoclopramida e neurolépticos; intoxicação por estricnina com ausência de trismo e hipertonía generalizada durante os intervalos dos espasmos e meningite com presença de febre alta desde o início, ausência de trismo e vômito. Além destes, inclui-se como diagnóstico diferencial a raiva, em que é possível observar a presença de convulsão, alterações de comportamento, ausência de trismo além de histórico de mordedura, arranhadura ou lambadura por animais.

## Controle e Tratamento

Os princípios básicos do tratamento do tétano são sedação, neutralização da toxina tetânica circulante por soro antitetânico, debridamento do foco infeccioso, erradicação do agente com administração de penicilina e medidas gerais de suporte. O animal deve ser mantido em ambiente escuro e silencioso, com temperatura estável e agradável a fim de minimizar os sinais apresentados (39).

A vacinação com toxóide é a principal forma de prevenção do tétano e o produto comercial encontra-se disponível para bovinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos, cães e gatos. A administração de reforço vacinal previamente aos procedimentos cirúrgicos, bem como a administração de soro antitetânico no momento ou após os mesmos é essencial para a profilaxia da doença em equinos (37).

## BOTULISMO

### Histórico

O botulismo, derivado do latim *botulus*, que pode ser traduzido como embutido, foi descrito pela primeira vez em 1820, na Alemanha, após vários casos de paralisia flácida em humanos associada à ingestão de embutidos e molhos com carnes. Tido inicialmente como um fungo, foi apenas entre 1895 e 1897 que se demonstrou que o botulismo era causado pela toxina de um bacilo anaeróbio, denominado como *Bacillus botulinus*. Durante esse mesmo período, utilizando um filtrado de cultivo celular, livre de bacilos e esporos, sinais de paralisia foram reproduzidos em animais de laboratório, confirmando a existência de uma toxina (40).

### Etiopatogenia

Atualmente denominado *Clostridium botulinum*, este bacilo anaeróbio é classificado em sete tipos (A, B, C, D, E, F e G), baseado na especificidade antigênica da neurotoxina (BoNT) produzida por cada estirpe. Codificadas pelo gene *BoNT*, essas toxinas são produzidas como cadeias polipeptídicas de 150 kDa, as quais são clivadas em duas cadeias menores, anteriormente à liberação pelo micro-organismo. Sendo assim, origina-se uma cadeia pesada (HC), de 100 kDa, e uma cadeia leve (LC), de 50 kDa, que permanecem ligadas por meio de uma ligação dissulfeto. A origem do gene *BoNT* varia entre os tipos de *C. botulinum*: tipos A, B, E e F, os quais causam o botulismo humano, são de origem cromossomal; tipos C e D,

responsáveis pela grande maioria dos casos da doença nos animais, possuem origem em bacteriófagos; já para o tipo G a origem é plasmidial (41, 42).

O mecanismo de ação das BoNTs é dotado de três etapas: ligação, translocação e atividade enzimática. Na primeira etapa, as HCs se ligam às membranas de neurônios, principalmente colinérgicos, por meio de um sistema duplo-receptor, constituído por um gangliosídeo e um componente proteico. Em seguida, as BoNTs são translocadas para o citoplasma neuronal via endocitose. Acredita-se que, durante esta etapa, as HCs formem poros na membrana, pelos quais as LCs passam do meio extracelular para o intracelular neuronal. Finalmente, as LCs clivam uma ou mais proteínas SNARE, responsáveis pela ancoragem e fusão de vesículas contendo neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos. Como resultado, ocorre redução da liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares, o que leva à incapacidade para contração muscular ou paralisia flácida dos músculos esqueléticos. Cada sorotipo cliva ligações peptídicas específicas de uma ou mais proteínas SNARE (43).

## A doença

As espécies animais possuem diferentes susceptibilidades às BoNTs e ao botulismo. Os equinos parecem ser sensíveis a todos os sorotipos. Os bovinos são susceptíveis aos tipos C e D, raramente acometidos pelos tipos A e B, apresentando quadros agudos ou subagudos. A doença nos ovinos se dá comumente de forma crônica. Os cães são menos sensíveis, sendo o botulismo causado pelos sorotipos A, B e C, mas de forma rara. Já as aves são acometidas pelos tipos C e, mais raramente, A e E, embora elas possam eliminar todos os sorotipos em seus dejetos (44).

O botulismo em bovinos foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1970, no Piauí, e 13 anos depois no Rio Grande do Sul. A partir de então, o botulismo nos ruminantes domésticos começou a ocorrer de forma epizootica. Animais com alta exigência nutricional, como fêmeas gestantes ou em lactação, criados em solos e pastagens pobres em minerais, principalmente fósforo, sem suplementação mineral adequada, desenvolviam o hábito de osteofagia (ingestão de ossos) ou sarcófagia (ingestão de cadáveres), buscando suprir suas deficiências minerais. Porém, concomitantemente, ingeriam as BoNTs pré-formadas durante a decomposição das carcaças, o que levava à grandes epidemias da doença com morte de milhares de animais (9, 37, 45).

Nas duas últimas décadas, o botulismo dos ruminantes vem ocorrendo principalmente na forma de surtos esporádicos. Nesses surtos, as BoNTs ingeridas pelos animais têm origem em alimentos contaminados com matéria orgânica em decomposição, tais como cama de frango, feno, grãos, rações e silagens de má qualidade ou mal armazenados. Além destes, cochos de água com carcaças de pequenos animais ou outros tipos de matéria orgânica em decomposição, bem como poços e lagoas com água estagnada podem servir como fonte de BoNTs para os animais (46-48).

O período de incubação e a severidade do botulismo dependerão da quantidade de toxina ingerida e da susceptibilidade da espécie animal. Nos ruminantes, o curso da doença pode ser de horas a poucas semanas e a letalidade é próxima dos 100%. Os sinais clínicos iniciais são dificuldade de locomoção, incoordenação dos membros posteriores, com progressão cranial da paralisia flácida. O animal entra em estado pré-agnônico, sendo que a morte, precedida por coma, ocorre devido à parada cardiorrespiratória. Durante toda a sintomatologia, o psiquismo dos animais permanece inalterado. Lesões à necropsia são raras e limitadas à petéquias no miocárdio como consequência da agonia respiratória, que precede o óbito (9, 37).

Possuindo altas taxas de letalidade e mortalidade, o botulismo é considerado uma das doenças mais importantes que acometem aves silvestres e criações avícolas de subsistência. Destacam-se como fontes das BoNTs para aves: poços e lagoas com água estagnada; larvas de

moscas e outros invertebrados que se desenvolvem em matéria orgânica em decomposição; alimento ou água fornecidos contendo matéria orgânica em decomposição (49-51). Menos comumente, pode ocorrer o botulismo endógeno, com produção das BoNTs no intestino das aves ou em feridas contaminadas por esporos. Clinicamente, o botulismo nas aves é caracterizado por uma paralisia simétrica ascendente, acometendo patas, asas, pescoço e pálpebras, concomitantemente com perda de penas e psiquismo inalterado. A morte ocorre por parada cardiorrespiratória (52, 53).

## Diagnóstico

O diagnóstico do botulismo é baseado nos dados epidemiológicos, sinais clínicos dos animais acometidos e na detecção das BoNTs em espécimes clínicos e/ou fontes de intoxicação. Estes podem compreender os conteúdos rumenal, gástrico e intestinal, fígado, soro, além de amostras dos alimentos e água que os animais possam ter ingerido. O teste padrão para a pesquisa das BoNTs é o bioensaio em camundongos. Esse teste baseia-se na injeção intraperitoneal das amostras diluídas em camundongos, se houver toxina, os camundongos desenvolvem sinais típicos de botulismo, como pêlos arrepiados, fraqueza muscular e dispneia, que se manifesta por estreitamento da cintura, denominado “cintura de vespa”. O tipo da BoNT é determinado pela neutralização da toxina com sua antitoxina específica. Embora o bioensaio em camundongos seja altamente específico e sensível, com limites de detecção de até 0,01 ng/ml de amostra, outros testes “*in vitro*” encontram-se disponíveis ou em desenvolvimento. Destacam-se os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), a reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real, quimioluminescência, eletroquimioluminescência, radioensaio, imunensaio de fluxo lateral, ensaio da endopeptidase e a microfixação do complemento (54, 55).

## Controle

A vacinação com os toxóides C e D de *C. botulinum* é a principal forma de controle do botulismo dos animais domésticos, com exceção apenas para as aves. Em associação, outras medidas são extremamente importantes, principalmente aquelas que visam impedir a ingestão das BoNTs pré-formadas pelos animais. Essas medidas compreendem: suplementação mineral adequada dos ruminantes domésticos; retirada das carcaças de mamíferos e aves das pastagens e beiras de cursos de água; produção, armazenamento e fornecimento adequados de alimentos de alta qualidade; não fornecer cama de frango aos ruminantes domésticos sob hipótese alguma; fornecer água de boa qualidade, e impedir que os animais tenham acesso a locais com água estagnada ou de qualidade desconhecida (9, 37).

## MIONECROSES

### A doença

O carbúnculo sintomático é uma doença aguda de bovinos e ovinos causada exclusivamente por *C. chauvoei*. Em bovinos, a doença ocorre de forma endógena, sendo frequentemente observada em animais jovens. A ingestão de esporos presentes no ambiente constitui-se na principal via de transmissão. Embora a maioria dos esporos seja excretada nas fezes, alguns podem deixar o intestino e serem distribuídos nos tecidos onde permanecem dormentes. A sequência de eventos que leva a distribuição dos endosporos nos tecidos não está clara, mas acredita-se que os mesmos sejam transportados por macrófagos. A gangrena gasosa é uma infecção exógena e necrosante de tecidos moles que acomete diversas espécies



de animais domésticos (56, 57). Essa patologia é causada por uma ou pela associação das seguintes espécies do gênero *Clostridium*: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii*. A ocorrência dessa doença está relacionada ao estrito contato entre estes agentes e os animais domésticos, o que favorece a contaminação de feridas decorrentes de práticas cirúrgicas e/ou sanitárias realizadas sem cuidados assépticos. Além disso, a injúria tecidual promove diminuição do potencial de oxirredução, alcalinização do pH e decomposição de produtos proteicos. Esses fatores contribuem para penetração, germinação e intensa proliferação de clostrídios, com consequente produção de toxinas responsáveis pelo quadro patológico da doença.

### Etiopatogenia

*C. septicum* foi a primeira espécie de clostrídio identificada, sendo denominada na época de *Vibrion septique* por Pasteur e Jubert, em 1877. A toxina alfa (Quadro 3), principal fator tóxico desse agente, se liga a receptores presentes na membrana celular dos hospedeiros onde são ativadas por clivagem proteolítica (58). Os monômeros ativados se difundem lateralmente na membrana, formando um oligômero (59) que sofre mudanças conformacionais até que um poro ativo que atravessa a membrana citoplasmática seja instalado. O poro promove alteração da permeabilidade celular, seguida por influxo de água e consequente ruptura, determinando lise e citotoxicidade celular (60).

Embora as descrições sobre gangrena gasosa e carbúnculo sintomático tenham sido feitas desde a metade do século XIX, *C. chauvoei* só foi descrito em 1880. Diferentemente das demais bactérias causadoras de mionecroses, foram realizados poucos estudos buscando elucidar a atividade tóxica e os mecanismos de ação das toxinas produzidas por *C. chauvoei*. A toxina CctA (Quadro 3) foi recentemente identificada como o principal fator de virulência desse micro-organismo, tendo capacidade de conferir proteção a animais vacinados com seu toxóide (61). No entanto, considera-se necessário a realização de outros estudos para melhor caracterizar esta e outras proteínas produzidas por *C. chauvoei*.

*Clostridium novyi* é classificado em quatro tipos, de A a D, de acordo com a produção de toxinas. O tipo A produz apenas a toxina alfa e é o agente da gangrena gasosa em humanos e animais domésticos. O tipo B produz, além da toxina alfa, a toxina beta. O tipo C não produz toxinas e o tipo D, hoje denominado *C. haemolyticum*, causa a hemoglobinúria bacilar em bovinos (62). A toxina alfa de *C. novyi* (Quadro 3) é uma glicosiltransferase que catalisa a glicosilação de pequenas GTPases, determinando a inativação das proteínas do citoesqueleto e desorganização dos filamentos de actina, resultando em efeitos como arredondamento celular, perda das junções intercelulares e aumento da permeabilidade endotelial que é compatível com o edema observado nas afecções causadas por essa bactéria (63).

*Clostridium sordellii* foi primeiramente isolado em 1922 por Alfredo Sordelli, um microbiologista argentino que denominou a bactéria de *Bacillus oedematis sporogenes* e desde 1928, o nome *C. sordellii* passou então a ser adotado (64). Os animais acometidos por *C. sordellii* tendem a apresentar lesões menos disseminadas e doloridas com dano vascular e hemólise reduzida (65). A virulência dessa bactéria é atribuída a inúmeras exotoxinas, embora apenas a toxina letal e a hemorrágica sejam consideradas essenciais para ocorrência da doença (Quadro 3). Ambas catalisam a glicosilação de pequenas GTPases, diferindo apenas quanto as GTPases alvos (66). Essas toxinas têm uma ação glicosiltransferase, modificando as GTPases que controlam o ciclo celular, apoptose, transcrição gênica e as funções estruturais da actina como morfologia celular, migração e polaridade (64). As modificações induzidas causam condensação da actina, culminando com a desorganização do citoesqueleto, arredondamento celular e eventual apoptose (66).

A primeira descrição de *C. perfringens* foi feita a partir de isolados de necropsia de um cadáver com enfisema disseminado (67). Esse clostrídio difere das demais bactérias do gênero

devido a sua relativa aerotolerância, alta e rápida taxa de crescimento e por sua instabilidade genética quanto à expressão dos genes codificadores de toxina. A toxina alfa (Quadro 3), principal fator tóxico envolvido nos casos de gangrena gasosa, interage com os fosfolípidos de membrana onde apresentam potente atividade fosfolipase C, hidrolisando a membrana de células eucariótica. Além disso, essa toxina determina o colapso vascular devido a uma exarcebação nas concentrações de ácido aracdônico e seus metabólitos nas células afetadas, que levam a uma reação inflamatória local e vasoconstrição (68). A toxina alfa ativa a proteína quinase C, determinando a produção do fator de agregação plaquetária com consequente formação de trombos intravasculares fato que contribui para inflamação e anóxia local. A obstrução luminal de capilares por neutrófilos é patognomônico da infecção por *C. perfringens*. As razões da leucoestase são desconhecidas, mas acredita-se que possa estar relacionada à necrose das células endoteliais que impossibilita o rearranjo do citoesqueleto que permite a transmigração das células de defesa (69).

Quadro 3: Clostrídios histotóxicos e caracterização dos principais fatores de virulência

	<i>C. septicum</i>	<i>C. chauvoei</i>	<i>C. novyi</i>	<i>Clostridium sordellii</i>		<i>C. perfringens</i>
Toxina	Alfa	CctA	Alfa	Letal	Hemorrágica	Alfa
Origem	Plasmídio/ cromossomo	Cromosso	Fago	Cromosso	Cromosso	Cromosso
Peso molecular (Kda)	48	33	250	300	260	42
Ação	Formação poros	Formação poros	Inativação de GTPases	Inativação GTPases	Inativação GTPases	Fosfolipase C

### Sinais Clínicos e anatomo-histopatológicos

Quando a gangrena gasosa ou o carbúnculo sintomático não são rapidamente controlados, o animal desenvolve toxemia sistêmica e choque. A morte ocorre como consequência do efeito das toxinas na hemodinâmica do sistema vascular. Clinicamente o animal apresenta temperatura elevada ou normal, anorexia e depressão. Quando um membro é atingido, observa-se dificuldade de locomoção e aumento de volume variável associado à crepitação subcutânea, devido a grande quantidade de gás produzida pela multiplicação bacteriana no foco de infecção, edema e hemorragia. Por vezes, essas alterações são tão intensas que a pele apresenta-se tensionada difusamente vermelha ou preta, com equimoses e sufusões. Não é raro a observação de uma linha delimitando a parte infectada da sadia. Ao corte, pode ser observado extravasamento de líquido, com bolhas de gás e hemorragia do subcutâneo. As fáscias e feixes musculares podem estar separados quando há intensa quantidade de gás. A musculatura apresenta-se intensamente hemorrágica, enfisematosa e com áreas cinza, indicativas de necrose. Histologicamente observam-se fibras musculares difusamente tumefeitas, eosinofílicas, com perda de estriações (degeneração hialina) e/ou difusamente fragmentadas (necrose flocular), na presença de bacilos. A infiltração inflamatória varia de ausente a moderada, constituída principalmente por neutrófilos, sendo observada também hemorragia, edema e gás em graus variáveis no tecido. O carbúnculo também pode correr em sua forma visceral e assintomática, quando órgãos internos, tais como a língua, o diafragma ou o coração, são acometidos. Consequentemente, o animal não apresenta lesões visíveis, e os casos de morte-súbita são frequentes (70).

## Diagnóstico

Os clostrídios são micro-organismos saprófitos que promovem a decomposição da carcaça de animais mortos, por isso o material deve ser coletado e imediatamente após a morte ou eutanásia do animal. O material pode ser remetido fresco, resfriado, congelado ou fixado em formalina neutra 10%. O diagnóstico laboratorial das mionecroses é apresentado no quadro 4.

Quadro 4: Métodos para diagnóstico das mionecroses clostridiais.

Método	Vantagem	Desvantagem	Ref.
Isolamento bacteriano	Execução relativamente simples, com meios e reagentes comuns aos laboratórios de bacteriologia de anaeróbios.	Demorado (cerca de 48h) e pode incorrer resultados imprecisos devido a diferente habilidade de crescimento e tolerância ao oxigênio dos clostrídios histotóxicos	(71)
Imunofluorescência direta	Protocolo prático e rápido (cerca de 4 h) que pode ser realizado diretamente do <i>imprint</i> do material coletado.	Requer anticorpos conjugados com fluorocromos e microscópio especial para leitura.	(71)
Imunoistoquímica	A remessa do material em formol evita a autólise dos mesmos impedindo que clostrídios saprófitos se multipliquem. A execução é relativamente simples, sendo a leitura realizada por microscopia de luz.	Relativamente demorado, dependendo de processamento histológico anterior a execução.	(70)
PCR	Execução relativamente simples e rápida.	Requer a etapa de isolamento prévio, somando as desvantagens do método.	(57)

## Controle e Tratamento

Os animais acometidos devem ser rapidamente tratados, devido ao curso superagudo da doença, com administração intravenosa de altas doses de penicilina. As chances de recuperação são maiores para animais no início da infecção ou aqueles cuja lesão muscular não esteja disseminada, mas, em geral, os tratamentos não são bem sucedidos. A medida mais importante para controle e prevenção de surtos de mionecroses é a vacinação sistemática do rebanho. A utilização de vacinas resulta numa marcante redução da incidência destas doenças. Porém, é fundamental que sejam adotadas medidas de higiene, tais como a desinfecção de agulhas e instrumental cirúrgico, assepsia dos locais de aplicação de vacinas ou de procedimentos cirúrgicos, manejo adequado de carcaças, dentre outras (9).

## REFERÊNCIAS

1. Popoff MR, Bouvet P. Clostridial toxins. *Future Microbiol.* 2009;4:1021-64.
2. Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9:216-34.
3. Yaeger MY. Prospective and retrospective studies on *Clostridium perfringens* type A enteritis in neonatal swine. In: *Proceedings of the 38th Annual Meeting American Association of Swine Veterinarian*; 2007, Orlando. Orlando: AASV; 2007. p.101-3.
4. Moreno AM, Baccaro MR, Ferreira AJP, Campos DS. Detection of  $\beta 2$  toxin gene from *Clostridium perfringens* isolated in diarrheic piglets. *Arq Inst Biol.* 2003;70:135-8.

5. Costa GM, Assis RA, Lobato FCF, Abreu VLV, Santos JL, Uzal FA. Diarréia em leitões lactentes por *Clostridium perfringens* tipo A em granjas tecnificadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2004;56:401-4.
6. Van Asten AJM, Nikolaou GN, Gröne A. The occurrence of *cpb2*-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the  $\beta$ 2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet J.* 2010;183:135-40.
7. Lee KW, Lillehoj HS, Jeong W, Jeoung HY, An DJ. Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. *Poult Sci.* 2011;90:1381-90.
8. Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 2011;40:341-7.
9. Lobato FCF, Salvarani FM, Assis RA. Clostridioses dos pequenos ruminantes. *Rev Port Cienc Vet.* 2007;102:23-34.
10. Yaeger M, Funk N, Hoffman L. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest.* 2002;14:281-7.
11. Songer JG, Uzal FA. Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest.* 2005;17:528-36.
12. Miclard J, Jäggi M, Sutter E, Wyder M, Grabscheid B, Posthaus H. *Clostridium perfringens* beta-toxin targets endothelial cells in necrotizing enteritis in piglets. *Vet Microbiol.* 2009;137:320-5.
13. Colodel EM, Driemeier D, Schmitz M, Marlise G, Nascimento RAP, Assis RA, et al. Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do sul. *Pesqui Vet Bras.* 2003;23:173-8.
14. Riet-Correa F, Tabosa IM, Azevedo EO, Medeiros RM, Simões SVD, Dantas AF, et al. Doenças dos ruminantes e eqüinos no semi-árido da Paraíba. *Semi-árido Foco.* 2003;1:1-4.
15. Lobato FCF, Assis RA, Abreu VLV, Souza Júnior MF, Lima CGRD, Salvarani FM. Enterotoxemia em bovino. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2006;58:952-4.
16. Facury-Filho EJ, Carvalho AU, Assis RA, Lobato FCF, Rachid MA, Carvalho AA, et al. Clinicopathologic features of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in cattle. *Vet Pathol.* 2009;46:1213-20.
17. Oliveira DM, Pimentel LA, Pessoa AF, Dantas AF, Uzal FA, Riet-Correa F. Focal symmetrical encephalomalacia in a goat. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:793-6.
18. Vieira AAS, Guedes RMC, Salvarani FM, Silva ROS, Lobato FCF. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarréicos. *Arq Inst Biol.* 2008;75:513-6.
19. Lippke RT, Borowski SM, Marques SMT, Paesi SO, Almeida LL, Moreno AM, et al. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesqui Vet Bras.* 2011;6:505-10.

20. Silva ROS, Salvarani FM, Cruz Júnior ECC, Pires OS, Santos RLR, Assis RA, et al. Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Cienc Rural*. 2011;41:1130-5.
21. Songer JG. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Anim Health Res Rev*. 2004;5:321-6.
22. Hopman NE, Keessen EC, Harmanus C, Sanders IM, van Leengoed LA, Kuijper EJ, et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Vet Microbiol*. 2011;149:186-92.
23. Yaeger MJ, Kinyon JM, Glenn Songer J. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *J Vet Diagn Invest*. 2007;19:52-9.
24. Silva ROS, Guedes RMC, Lobato FCF. *Clostridium difficile* infection: main features and occurrence in domestic species in Brazil. *Cienc Rural*. 2013;43:73-80.
25. Baverud V. *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet Q*. 2002;24:203-19.
26. Preis IS, Silva ROS, Pires OS, Lobato FCF, Palhares MS, Maranhão RPA, et al. Enteritis associated with *Clostridium difficile* and opportunistic candidiasis in a foal. *Braz J Vet Pathol*. 2012;5:7-11.
27. Silva ROS, Moreira FM, Rezende JV, Pires OS, Maranhão RPA, Palhares MS, et al. First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Cienc Rural*. 2012;42:498-500.
28. Jhung MA, Thompson AD, Killgore GE, Zukowski WE, Songer G, Warny M, et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1039-45.
29. Delmée M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7:411-6.
30. Post KW, Jost BH, Songer JG. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. *J Vet Diagn Invest*. 2002;14:258-9.
31. Keessen EC, Hopman NE, van Leengoed LA, van Asten AJ, Hermanus C, Kuijper EJ, et al. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1816-21.
32. Medina-Torres CE, Weese JS, Staempfli HR. Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Vet Microbiol*. 2011;152:212-5.
33. Macleod-Glover N, Sadowski C. Efficacy of cleaning products for *C. difficile*: environmental strategies to reduce the spread of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in geriatric rehabilitation. *Can Fam Physician*. 2010;56:417-23.
34. Songer JG, Anderson MA. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Vet Microbiol*. 2008;128:204-6.

35. Calvo AC, Oliván S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R. Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. *Int J Mol Sci.* 2012;13:6883-901.
36. Cornile F, Roques BP. Tetanus and botulinum toxins are zinc metallopeptidases: molecular mechanisms and inhibition of their neurotoxicity. *J Soc Biol.* 1999;193:509-16.
37. Lobato FCF, Assis RA, Salvarani FM. Principais clostridioses dos ruminantes domésticos. *Rev Vet Zootec.* 2007;27:36-40.
38. Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 2ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998.
39. Driemeier D, Schild AL, Fernandes JC, Colodel EM, Corrêa AM, Cruz CE, et al. Outbreaks of tetanus in beef cattle and sheep in Brazil associated with disophenol injection. *J Vet Med Ser A Physiol Pathol Clin Med.* 2007;54:333-5.
40. Ledermann WD. The History of *Clostridium botulinum*. *Rev Chil Infect.* 2003;20 Suppl:39-41.
41. Brüggemann H. Genomics of clostridial pathogens: implication of extrachromosomal elements in pathogenicity. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8:601-5.
42. Swaminathan S. Molecular structures and functional relationships in clostridial neurotoxins. *FEBS J.* 2011;278:4467-85.
43. Aoki KR, Smith LA, Atassi MZ. Mode of action of botulinum neurotoxins: current vaccination strategies and molecular immune recognition. *Crit Rev Immunol.* 2010;30:167-87.
44. Rodloff AC, Krüger M. Chronic *Clostridium botulinum* infection in farmers. *Anaerobe.* 2012;18:226-8.
45. Baldassi L, Hipolito M, Portugal MASC, Calil BEM, Moulin AAP, Pires DC. Bovine botulism: laboratorial confirmation of clinical diagnosis during the period 1986-1989. *Rev Saude Publica.* 1991;25:371-4.
46. Dutra IS, Döbereiner J, Rosa IV, Souza LAA, Nonato M. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. *Pesqui Vet Bras.* 2001;21:43-8.
47. Costa GM, Salvador SC, Pereira MN. Botulism in dairy cattle in southern Minas Gerais, Brazil. *Cienc Rural.* 2008;38:2068-71.
48. Lobato FCF, Salvarani FM, Silva ROS, Souza AM, Lima CGRD, Pires PR, et al. Botulism in ruminants being fed with poultry litter. *Cienc Rural.* 2008;38:1176-8.
49. Degernes LA. Waterfowl toxicology: a review. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2008;11:283-300.
50. Fossum O, Jansson DS, Etterlin PE, Vågsholm I. Causes of mortality in laying hens in different housing systems in 2001 to 2004. *Acta Vet Scand.* 2009;51:1-9.

51. Hoque MA, Skerratt LF, Rahman MA, Rabiul Alam Beg ABM, Debnath NC. Factors limiting traditional household duck production in Bangladesh. *Trop Anim Health Prod.* 2010;42:1579-87.
52. Trampel DW, Smith SR, Rocke TE. Toxicoinfectious botulism in commercial caponized chickens. *Avian Dis.* 2005;49:301-3.
53. Takeda M, Kasai H, Torii Y, Mukamoto M, Kohda T, Tsukamoto K, et al. Protective effect of botulinum C/D mosaic toxoid against avian botulism. *J Vet Med Sci.* 2006;68:325-30.
54. Lindström M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:298-314.
55. Chaudhry R. Botulism: a diagnostic challenge. *Indian J Med Res.* 2011;134:10-2.
56. Assis RA, Lobato FCF, Nascimento RAP, Maboni F, Pires PS, Silva ROS, et al. Mionecroses clostridiais bovinas. *Arq Inst Biol.* 2010;77:331-4.
57. Ribeiro MG, Silva RO, Pires PS, Martinho AP, Lucas TM, Teixeira AI, et al. Myonecrosis by *Clostridium septicum* in a dog, diagnosed by a new multiplex-PCR. *Anaerobe.* 2012;18:504-7.
58. Gordon VM, Nelson KL, Buckley JT, Stevens VL, Tweten RK, Elwood PC, et al. *Clostridium septicum* alpha toxin uses glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins receptors. *J Biol Chem.* 1999;274:27274-80.
59. Tweten RK. *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Vet Microbiol.* 2001;82:1-9.
60. Melton-Witt JA, Bentsen LM, Tweten RK. Identification of functional domains of *Clostridium septicum* alpha toxin. *Biochemistry.* 2006;45:14347-54.
61. Frey J, Johansson A, Bürki S, Vilei EM, Redhead K. Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis. *Vaccine.* 2012;30:5500-5.
62. Songer JG. Clostridial diseases of small ruminants. *Vet Res.* 1998;29:219-32.
63. Titball R, Duchesnes C, Granum PE, Menozzi MG, Peck M, Pelkonen S, et al. Genus *Clostridium*: clostridia in medical, veterinary and food microbiology. Luxembourg: European Concerted Action; 2006.
64. Aldape MJ, Bryant AE, Stevens DL. *Clostridium sordellii* infection: epidemiology, clinical findings, and current perspectives on diagnosis and treatment. *Clin Infect Dis.* 2006;43:1436-46.
65. Cunniffe JG. *Clostridium sordellii* bacteraemia. *J Infect.* 1996;33:127-9.
66. Gerhard R. Large clostridial cytotoxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2004;152:23-47.

67. Welch WH, Nuttall GHF. A gas producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*, Nov. Spec.) capable of rapid development in the blood vessels after death. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1982;3:81-91.
68. Titball RW, Naylor CE, Basak AK. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe.* 1999;5:51-64.
69. Hickey MJ, Kwan RY, Awad MM, Kennedy CL, Young LF, Hall P, et al. Molecular and cellular basis of microvascular perfusion deficits induced by *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum*. *PloS Pathog.* 2008;4:1-9.
70. Pires PS, Silva ROS, Salvarani FM, Ecco R, Lobato FCF. Comparative analysis of lesions caused by histotoxic clostridia in experimentally induced myonecrosis. *Semin Cienc Agrar.* 2012;33;2337-46.
71. Assis RA, Lobato FCF, Dias LD, Uzal FA, Martins NE, Silva N. Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. *Rev Med Vet.* 2001;82:68-70.

Escola de Veterinária da UFMG

**Recebido em: 06/12/12**

**Aceito em: 17/01/13**



## CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS: CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS

Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho<sup>1\*</sup>  
Tiago Luis Eilers Treichel<sup>1</sup>  
Jaime Sardá Aramburú Junior<sup>1</sup>  
Mauricio Borges da Rosa<sup>1</sup>  
Fabiola Dalmolin<sup>1</sup>  
Maurício Veloso Brun<sup>2</sup>  
Alexandre Krause<sup>2</sup>  
Ney Luis Pippi<sup>3</sup>

### RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) adultas são células-tronco somáticas presentes em pequenas quantidades em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, incluindo a medula óssea (MO), o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos. Por ser o tecido mais utilizado e caracterizado para o estudo das propriedades das células-tronco e por ter sido o primeiro empregado em terapia celular, a medula óssea é um dos principais tecidos para a obtenção de CTMs. Estudos contemporâneos vêm sendo realizados, descrevendo a utilização alógena e autógena das CTMs para a reparação de diversos tecidos. Além da terapia celular em animais domésticos, sua importância em Medicina Veterinária deve-se também à geração de modelos experimentais aplicáveis a paciente humanos. A presente revisão objetivou trazer as características e os usos atuais das CTMs adultas derivadas da MO, do tecido adiposo e polpa dentária, bem como os protocolos laboratoriais e experimentos *in vivo* desenvolvidos em um laboratório de cirurgia experimental visando a aplicação destas células em pacientes veterinários e a pesquisa translacional.

**Palavras-chave:** células multipotentes, cães, humanos, terapia celular.

### ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS: CHARACTERISTICS AND EXPERIMENTAL USE IN ANIMALS

#### ABSTRACT

The MSCs are defined as a subpopulation of somatic stem cells which are present in small amounts in perivascular regions of virtually all adult tissues, including bone marrow (BM), adipose tissue, periosteum, muscle and parenchymatous organs. Because BM is the most used and characterized tissue to define stem cells properties and for being the first in cell therapy, BM is one of the main sources for MSCs. Contemporary studies have been performed, describing the use of autologous and allogeneic MSC for tissue repair in different organs. In addition to cell therapy in domestic animals its application in veterinary medicine also provides the generation of experimental models for human diseases. This review aims to bring the features and current uses of MSCs derived from adult bones tissue, adipose tissue and dental pulp, as well as laboratory protocols and *in vivo* experiments developed in a laboratory

<sup>1</sup> Médico Veterinário, aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Rua João Batista da Cruz Jobim, 115/203, Bairro Medianeira, 97060-330, Santa Maria, RS, Brasil. Fone: 5599954161 saulovet2011@hotmail.com. \*Autor para correspondência.

<sup>2</sup> Médico Veterinário, Doutor, Professor do Departamento de Clínica de Pequenos Animais (DCPA) e PPGMV da UFSM.

<sup>3</sup> Médico Veterinário, PhD, Professor do DCPA e PPGMV da UFSM.

of experimental surgery aiming the application of these cells in veterinary patients and translational research.

**Keywords:** multipotent cells, dogs, human, cell therapy.

## CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ADULTAS: CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

### RESUMEN

Las células madre mesenquimales (CMM) son células madre somáticas adultas presentes en pequeñas cantidades en las regiones perivasculares de todos los tejidos adultos, incluyendo la médula ósea (MO), el tejido adiposo, el periostio, tejido muscular y los órganos parenquimatosos. Por su alta utilización y caracterización en el estudio de las propiedades de las células madre, así como por haber sido utilizada por primera vez para la terapia celular, la médula ósea es uno de los principales tejidos para la obtención de CMMs. Actualmente han sido realizados estudios, que describen el uso de CMM alogénicas y autólogas para la reparación de diversos tejidos. Además de la terapia celular en los animales domésticos, su importancia en medicina veterinaria se debe también a la generación de modelos experimentales. Esta revisión tiene como objetivo revisar las características y usos actuales de las CMM derivadas de la masa ósea de adultos, tejido adiposo y pulpa dental, así como los protocolos de laboratorio y experimentos in vivo desarrollados en un laboratorio de cirugía experimental. Estos protocolos están destinados al uso de CMMs en pacientes veterinarios y en investigación translacional.

**Palabras clave:** células multipotenciales, perros, humanos, terapia celular.

### INTRODUÇÃO

As recentes descobertas sobre a biologia das células-tronco embrionárias (CTE) e somáticas (CTS), a descrição de novas fontes de células e a possibilidade de sua futura aplicação clínica tornam essas células uma promissora opção terapêutica para diversas enfermidades. O reconhecimento dessa importância culminou com a nomeação de dois pesquisadores, cujas descobertas revolucionaram a pesquisa em células-tronco, o prêmio Nobel em fisiologia e medicina de 2012 a Sir John B. Gurdon e Shinya Yamanaka. O Brasil possui legislação específica para a pesquisa e utilização terapêutica de células-tronco viabilizando estudos nesta área pelo financiamento de projetos em institutos de terapia celular e centros de excelência (1).

O conceito de células-tronco surgiu a partir de experimentos pioneiros realizados no início dos anos 1960 por Ernest A. McCulloch e James E. Till que observaram a presença de colônias hematopoiéticas no baço de camundongos irradiados e que haviam recebido transplante de medula. Essas colônias eram derivadas de uma única célula, a célula-tronco (2). Outros estudos, realizados nas décadas de 1970 e 1980 pelo grupo de pesquisa de Alexander Friedenstein ampliaram o potencial de uso das MSCs, demonstrando sua capacidade de auto-renovação e diferenciação (3). Na época, devido à semelhança morfológica com fibroblastos em cultura, foram denominadas unidades formadoras de colônia fibroblástica (UFC-F) (4). Nas décadas seguintes, extensas pesquisas foram desenvolvidas para desvendar o potencial terapêutico das MSCs (3).

As MSCs são definidas como uma população de células-tronco somáticas presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a MO, o tecido adiposo, o periosteio, o tecido muscular e órgãos parenquimatosos. A MO constitui

um dos principais sítios para a obtenção dessas células, assim como de células-tronco hematopoiéticas e endoteliais (5). Embora as células-tronco embrionárias e as de pluripotência induzida sejam as de maior potencial de diferenciação, existem várias limitações à sua utilização devido a seu comportamento biológico, considerações éticas e manipulação genética (6).

A capacidade de dar origem a diferentes tecidos, entretanto, não está restrita apenas às células-tronco embrionárias. Células isoladas de tecidos adultos (mesenquimal, hematopoiético e nervoso) podem dar origem a vários tipos de tecidos, como o pancreático, o hepático, o cardíaco e o nervoso. Acredita-se que essas células desempenhem um importante papel na regeneração após injúria (1,7). Assim, o transplante de células-tronco adultas representa uma promissora terapia para doenças como cirrose hepática, o *diabetes mellitus*, a doença de Alzheimer, a insuficiência cardíaca e o infarto agudo do miocárdio (8). Nesse contexto, se tornaram foco de numerosas pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras (5).

A presente revisão objetivou trazer as características e os usos atuais das MSCs adultas derivadas da MO, do tecido adiposo e polpa dentária, bem como os protocolos laboratoriais e experimentos *in vivo* desenvolvidos em um laboratório de cirurgia experimental visando a aplicação destas células em pacientes veterinários.

### Características das MSCs

Em cultura e condições adequadas de cultivo, as MSC exibem morfologia fibroblastoide (Figura 1) e são capazes de se diferenciar e dar origem a osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais e cardíacas, dentre outras (5, 9). De acordo com resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa em CTMs, essas células devem apresentar o seguinte padrão fenotípico CD73+, CD90+, CD105+, CD45-, CD34-, CD14 ou CD11b-, CD79- ou CD19-, HLA-DR (10, 11).

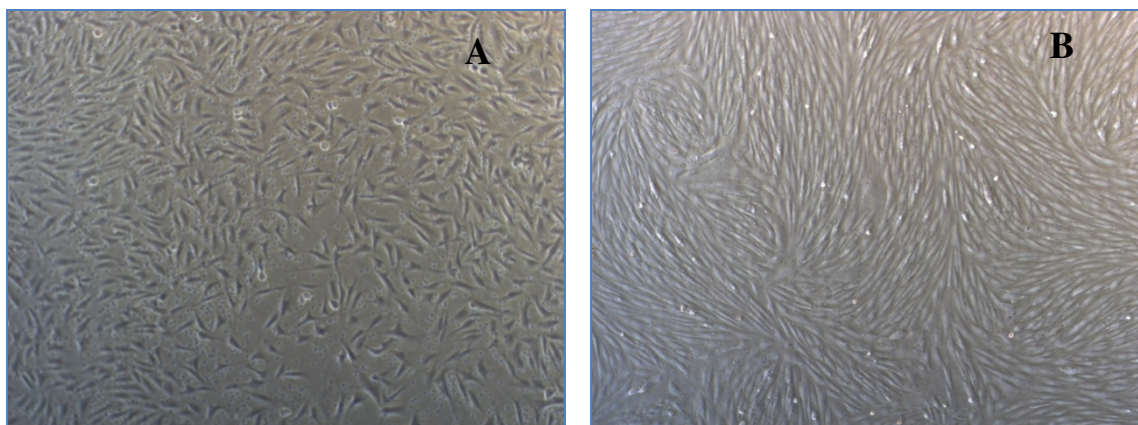


Figura 1. Cultura de MSCs adultas derivadas do tecido adiposo de coelhos. (A) células ao 5º dia de cultura e (B) células no 12º dia de cultura. Observar a característica fibroblastoide das MSCs. (Aumento de 50X)

As primeiras evidências do papel das MSCs sobre o sistema imune mostraram que a administração intravenosa delas em babuínos foi capaz de prolongar a sobrevivência de enxertos alogênicos de pele, de forma similar a potentes drogas imunossupressoras utilizadas rotineiramente na clínica (12). Além dos efeitos imunomoduladores, as MSCs expressam pequenas quantidades de complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I) e níveis negligenciáveis de MHC-II e/ou não expressão MHC-II em sua superfície. Durante o processo

de seleção clonal positiva e negativa realizado pelas células de defesa do organismo (reconhecimento do próprio e do não-próprio) utiliza-se o MHC. Dessa forma, essas células seriam toleradas pelo organismo receptor. Também, o contato célula-célula faz com que as MSCs produzam diferentes tipos de fatores de crescimento solúveis, incluindo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), fator estimulador de crescimento de macrófago (M-CSF) e diversas interleucinas (IL-1,6,7,8,11,12,14,15), que influenciam fibroblastos e células granulocíticas envolvidas no processo de inflamação (5).

Foi observada ação imunomodulatória das CTMs *in vitro*, onde essas células alteraram o padrão de citocinas pelas células T *helper* e diminuição na liberação de mediadores como o fator de necrose tumoral (TNF) e interferon. Além disso, as MSCs inibem a proliferação de células T após estímulo por aloantígenos e agentes mitogênicos e impedem o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos. Essas ações poderiam interferir na modulação da inflamação, indução de tolerância, redução de complicações como a rejeição de alo-transplantes e a doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD) em humanos (13). *In vivo*, as MSCs prolongaram a sobrevida de enxertos de pele e apresentaram vários efeitos imunomoduladores (14).

### ***1. Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BMSCs)***

Nas três últimas décadas as BMSCs têm sido alvo de importantes pesquisas científicas em função das suas relevantes propriedades para o uso na terapia celular. Por exemplo, a sua grande habilidade de diferenciação em osteoblastos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, levou a sua utilização clínica em estudos pilotos para distúrbios ósseos hereditários e deficiências osteogênicas. Já a habilidade dessas células em promover revascularização após injúria isquêmica levou à realização de estudos pré-clínicos em modelos animais de grande e pequeno porte com isquemia miocárdica (15).

Técnicas estudadas atualmente na engenharia de tecidos para a regeneração de bexiga constituem-se em promessa para a substituição parcial ou total do órgão em pacientes com bexiga neuropática, câncer, cistite intersticial, e outras doenças inflamatórias vesicais (16). Neste órgão, o interesse inicial centrou-se na regeneração dos tecidos, na esperança de permitir que a ampliação vesical autóloga contornasse os múltiplos problemas associados com a enterocistoplastia. No entanto, com maiores informações sobre a potencial diferenciação celular, a terapia genética bem sucedida e a progressão da imunomodulação, as possíveis aplicações das BSCs para enfermidades da bexiga podem ser ampliadas. Estudos demonstram que estas células poderão provir o desenvolvimento de enxertos vesicais, podendo diferenciar-se em urotélio e músculo liso (3).

O potencial das BMSCs semeadas em arcabouço biodegradável foi avaliado na regeneração da bexiga em modelo canino, comparando com o músculo liso em relação à capacidade de crescimento e contratilidade vesicais. Os pesquisadores concluíram que o arcabouço semeado demonstrou aparência celular histologicamente semelhante à do órgão original, bem como a contratilidade do músculo liso, afirmando que as BSCs podem servir como alternativa de fonte celular para a engenharia de tecidos urológica (17).

Na odontologia, o uso destas células também é bastante promissor. Cientistas afirmaram que os fatores de crescimento e outras proteínas secretadas pelas BSCs podem promover a regeneração do dente. O estudo combinou a utilização das BSCs com as células do germe dentário (DBC) do segundo molar não erupcionado semeadas em arcabouço e autotransplantadas em suínos. Os autores demonstraram que as DBCs combinadas com as da medula óssea em arcabouço adequado podem regenerar dentes nesse modelo. Além disso, o mesmo estudo também indicou que o fluido da medula óssea, pode promover a regeneração dentária. No entanto, questões que envolvem a determinação de forma, controle de tamanho e

erupção do dente precisam ser resolvidas. Conforme os autores, outros estudos deverão ser realizados para aperfeiçoar a erupção dental, podendo fornecer um novo tratamento para perda de dentes no futuro (18).

## **2. Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs)**

Em 2001 foi produzido um trabalho pioneiro, o qual afirmava conter MSC no lipoaspirado humano e que este poderia se tornar uma fonte alternativa às BSCs (19). Foi relatado que, a partir daí, deu-se início a uma série de pesquisas, em que inúmeros autores conseguiram desenvolver várias linhagens celulares a partir de ADSCs humanas e de modelos experimentais animais. Segundo o autor, a grande vantagem era que a captação do tecido doador de CT não acarretaria morbidade relevante (4).

Atualmente, o interesse pelas ADSCs tem aumentado muito na medicina, principalmente em função da facilidade de obter grandes quantidades destas células pelo processo de lipoaspiração, utilizando apenas anestesia local (11). Quando comparadas com as BSCs, as ADSCs são igualmente capazes de se diferenciar em células e tecidos de origem mesodérmica. Como o tecido adiposo humano está presente em muitas regiões, é de fácil obtenção em grandes quantidades sob anestesia local com pouco desconforto para o paciente, podendo se configurar como fonte alternativa de células-tronco para a regeneração dos tecidos mesenquimais e engenharia de tecidos (6).

Foram citados usos das ADSCs em humanos para reconstrução de maxila, em fístulas associadas ou não à doença de Crohn, em escaras de decúbito e na esclerose múltipla, entre outras. Os autores afirmaram que os diversos ensaios clínicos demonstraram que este tipo de terapia está se tornando realidade. Surpreendentemente, resultados sugerem que a eficiência das ADSCs na medicina regenerativa pode estar relacionada mais a sua capacidade de modular a imunidade e/ou inflamação do que para seus potenciais de diferenciação. A relevância fisiológica deste fenômeno precisa ser melhor documentada, condição que poderia trazer ganhos de eficiência e, talvez, novas possibilidades terapêuticas para estas células (11).

Relacionado ao uso em pele, afirmou-se que a administração tópica de ADSCs pode acelerar o processo de cicatrização da ferida cutânea. No estudo do autor, úlceras cutâneas crônicas quimicamente induzidas foram cobertas com esponja de colágeno tipo I associada à ADSCs, o que aumentou a granulação tecidual e densidade capilar quando comparado com a utilização da esponja de colágeno isolada (6).

Também foi testado o uso das ADSCs para reconstrução de bexiga, induzindo estas a diferenciação *in vitro* em músculo liso vesical e semeando-as em arcabouço tridimensional com o objetivo de verificar se as células iriam continuar a diferenciação e crescimento formando nova estrutura muscular vesical. Após a semeadura de 14 dias, o arcabouço cultivado foi implantado em fêmeas de ratos adultas atímicas, as quais haviam sofrido cistectomia com remoção de aproximadamente 50% da bexiga. O estudo concluiu que as ADSCs podem ser diferenciadas em músculo liso e semeadas em arcabouço vesical tridimensional, mantendo a expressão de marcadores moleculares de músculo liso. As ADSCs foram capazes de manter sua diferenciação em músculo liso e viabilidade *in vitro* e *in vivo* dentro da bexiga artificial. Os pesquisadores concluíram que a grande disponibilidade de ADSCs, combinado com a sua facilidade de obtenção e capacidade de se diferenciarem em músculo liso contrátil, faz da ADSC uma alternativa não-embriônica competitiva para a regeneração da bexiga e de outros tecidos que possuam músculo liso (20).

## **3. Células-tronco mesenquimais derivadas da polpa dentária (DPSCs)**

Atualmente, as DPSCs estão sendo muito utilizadas na odontologia humana em função da facilidade de coleta, a qual está associada à baixa morbidade. A extração das células-tronco

do tecido pulpar é altamente eficiente, já que as mesmas possuem alta capacidade de diferenciação e boa interatividade com biomateriais, tornando-as ideais para reconstrução tecidual. Quando comparadas às BSCs, as DPSCs demonstraram melhor habilidade para diferenciação em tecidos calcificados, embora em diferentes linhagens. Verificou-se que após serem semeadas em arcabouço de hidroxiapatita, apresentaram diferenciação odontoblástica em vez de osteoblástica como as BSCs (21).

Após estudos aprofundados de cultura, histoquímica, microscopia eletrônica, RT-PCR, imunoistoquímica e citometria de fluxo com DPSCs humanas, verificou-se que estas células possuem potencial proliferativo elevado, capacidade de auto-renovação e diferenciação em várias linhagens. Os autores afirmaram que estas células podem servir como modelo para o estudo da diferenciação de células-tronco adultas *in vitro* e regeneração de tecidos *in vivo* (22).

Com o objetivo de caracterizar as células-tronco isoladas da polpa dentária de dentes de cães (cDPSCs), a fim de definir ainda mais o cão como modelo animal para a endodontia regenerativa, pesquisadores isolaram CTMs de dentes pré-molares recém extraídos de Beagles de 10 meses de idade. As células isoladas foram investigadas para suas propriedades por meio de análise de suas características clonogênica e de seus crescimentos, pela expressão de marcadores de superfície e pela avaliação do seu potencial osteo/odontogênico, adipogênico e neurogênico. Os resultados deste estudo mostraram que as cDPSCs foram capazes de se diferenciar em linhagem odontoblástica funcional, com potencial de mineralização ativa *in vitro*. No entanto, a diferenciação morfológica em odontoblastos, condição que é importante para a secreção de matriz dentinal uniforme, não foi evidente *in vitro*. Foi demonstrado que a dentina existente é necessária para guiar as células-tronco no espaço do canal e proporcionar a diferenciação em células odontoblásticas *in vivo*. Além disso, cDPSCs apresentaram superioridade na taxa de proliferação e diferenciação sobre as células-tronco mesenquimais derivadas da MO humana (hBMMSCs). No entanto, os potenciais de diferenciação neurogênica e adipogênica foram inferiores quando comparadas com as células-tronco da polpa dentária de dentes humanos (hDPSCs). Em geral, os dados apresentados neste estudo apoiam a utilização das cDPSCs na engenharia de tecidos dentários e, ainda, estabelecem o cão como modelo adequado na pesquisa odontológica (23).

Outros autores também afirmaram que a criopreservação destas células pode ser alternativa para a manutenção em laboratório. Foi observado que após longo prazo de preservação em temperaturas de  $-80^{\circ}\text{C}$ , osteoblastos diferenciados de DPSCs ainda são capazes de rapidamente reiniciar proliferação e produção de matriz mineralizada, de maneira semelhante a já demonstrada para células frescas. Além disso, a proliferação foi comparada à das células frescas, sem que ocorresse morte celular por apoptose (21).

### **Resultados de bancada**

Extensos protocolos já foram descritos para cultivo de células-tronco em vários animais, incluindo seres humanos (3).

A coleta de gordura para processamento das MSCs derivadas do tecido adiposo (ADSCs) em coelhos, pode ser realizada pela ressecção da bolsa adiposa interescapular ou por lipoaspiração. Em nosso laboratório é utilizada a técnica de ressecção da bolsa adiposa interescapular, sendo esta bastante eficiente para a obtenção de material suficiente para processamento e cultivo. São coletadas 10 gramas de tecido adiposo que, após processado, gera, em média,  $5 \times 10^6$  células, sendo estas após a quarta passagem (30 dias) aplicadas nos diferentes ensaios experimentais em animais. Em humanos, as pesquisas com isolamento das MSCs do tecido adiposo são mais comumente feitas com amostras obtidas de cirurgias de lipoaspiração. Nesse caso, esta é realizada de maneira seca, utilizando cânula reta de 20cm de comprimento, 3,5mm de diâmetro com três orifícios em linha e ponta romba (4).

A partir da obtenção da amostra, a individualização das células é obtida a partir de digestão enzimática com Colagenase tipo I, em agitação constante, a 37°C por 30 minutos. A solução é centrifugada para lavagem das células, que são colocadas em garrafas de cultivo celular, na concentração de  $10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Em uma variação de protocolo, a digestão é feita em placa de petri com uma solução de PBS e Colagenase tipo I a 0,075%. A amostra passa por repetidas centrifugações no processo de lavagem das células, que são colocadas nas garrafas de cultivo celular na concentração de 500mg de tecido adiposo/cm<sup>2</sup> (24). A lavagem das células é geralmente realizada com PBS (4, 24, 25). Em nosso laboratório utilizamos rotineiramente a solução de Hank's, sendo que não observamos diferença de eficiência quando utilizamos o PBS.

Torres (4), utilizando tecido adiposo de coelhos o tempo de digestão na colagenase foi de 60 minutos, enquanto Patricio (24), empregando tecido adiposo de cães, e Maciel (25), utilizando de gatos, foi de 30 minutos. O autor que utilizou tecido adiposo de coelhos não divulgou a viabilidade celular no seu trabalho, já os outros dois obtiveram 98% e 93%, respectivamente. No LATECER, o tempo utilizado para digestão por colagenase tipo II em tecido adiposo de cães e coelhos é de 25 minutos (Figura 2), já que a mesma é citotóxica e pode diminuir a viabilidade celular. No caso de células derivadas da polpa dentária de cães, o tempo deixado é de 60 minutos e a colagenase utilizada é a do tipo I. No caso da colagenase tipo II no tecido adiposo, é utilizada a proporção 1:3 (volume:volume) de tecido e enzima, já a do tipo I na polpa dentária é utilizada a proporção 1:5 (volume:volume). Logo após este tempo a neutralização é feita pela adição de meio de cultivo completo, em um volume de 1:1, obtendo-se, em média, 97% de viabilidade celular. Fadel (26), processando células derivadas do tecido adiposo de ovinos, utilizou protocolo de digestão enzimática com tripsina. Segundo o autor, o protocolo revelou quantidade de células esféricas, refringentes aderidas ao plástico da garrafa de cultura e após a primeira passagem as mesmas tornaram-se inviáveis. Para o meio de cultivo, a maioria dos autores utiliza Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbecco, com 10% de soro fetal bovino (SFB). No processamento de tecido adiposo de cão utilizou-se 15% de SFB na mistura (24). Em nosso laboratório também é utilizado o mesmo tipo de meio, com baixa glicose e 10% de SFB, porém, a fim de obter melhor adaptação das células ao cultivo utiliza-se meio contendo 20% de SFB para as primeiras passagens, sendo que, após a terceira passagem passa-se a utilizar 10% de SFB.

### ***Resultados in vivo***

O número de pesquisas visando terapias reparativas utilizando células-tronco tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, no Brasil e no mundo. Os resultados já estabelecidos e as possibilidades de sucesso estão gerando grandes expectativas entre a comunidade científica e a população leiga (1, 5). Diferentes pesquisas descrevem a utilização alógena e autógena das MSCs para a reparação de diversos tecidos. Importante campo de aplicação na Medicina Veterinária deve-se também à geração de modelos experimentais aplicáveis em pacientes humanos (5). As MSCs caninas, particularmente, também demonstraram potencial para uso em terapia celular, tanto em tecido ósseo como nos tecidos moles nesta espécie (9).



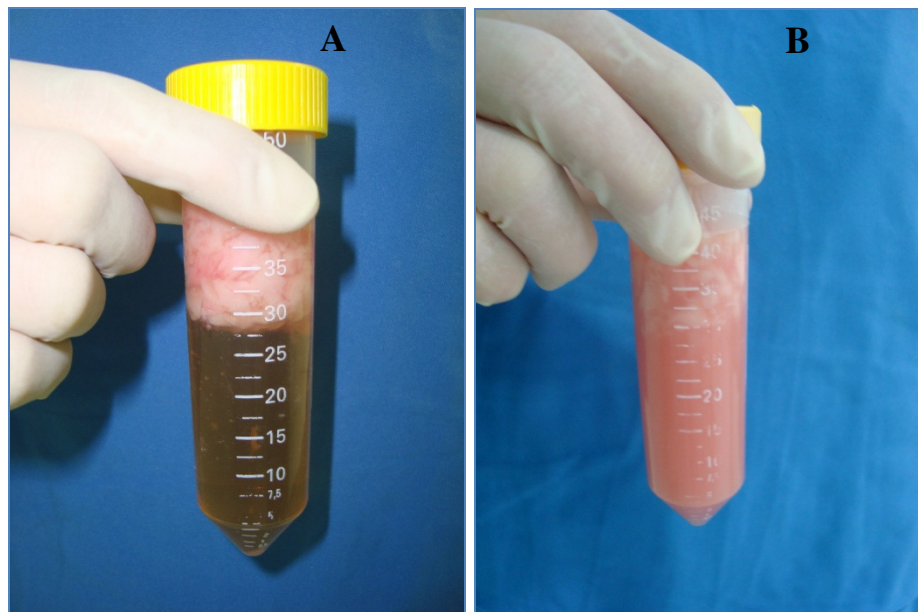


Figura 2. Digestão enzimática do tecido adiposo de coelhos. Tubo de polipropileno contendo fragmentos do tecido adiposo e collagenase tipo II antes (A) e após a digestão a 37°C pela collagenase tipo II apresentando aspecto leitoso (B).

Por muitos anos, a MO foi considerada a principal fonte de células-tronco para aplicações na engenharia de tecidos (27). Estas células possuem muitas propriedades, as quais promovem considerável potencial de utilização na terapia celular para várias doenças (15, 28). No entanto, um estudo em camundongos mostrou que as MSCs residem em praticamente todos os órgãos e tecidos, entre eles, cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, medula óssea, músculo, timo, pâncreas (29). Devido à facilidade de colheita e da abundância, as ADSCs tornam-se atrativas, sendo prontamente disponíveis no indivíduo adulto e cada vez mais populares para uso nos diversos sistemas orgânicos (27).

Nosso grupo objetivou avaliar a capacidade de regeneração do nervo tibial de coelhos Nova Zelândia, mediante a associação da terapia celular com técnica de tubulização por prótese de silicone. A partir dos resultados obtidos, observou-se a diminuição significativa da presença de degeneração walleriana nos animais tratados, sendo possível concluir que o tratamento com células-tronco mononucleares (CM) autólogas de medula óssea apresenta vantagens no processo de regeneração do nervo periférico sob a técnica de tubulização com 30 dias de pós-operatório (30). A associação de células mesenquimais provenientes da medula óssea de cães, associada à hidroxiapatita sintética (HA) favoreceu a regeneração óssea em defeitos realizados no osso alveolar da mandíbula de cães. Quando comparada ao uso somente da HA, esse processo de regeneração ocorreu de forma mais rápida em defeitos preenchidos com o biomaterial associado às CM (31). Oliveira et al. (32) avaliaram a utilização de CM da MO, associadas ou não com proteína morfogenética (rhBMP-2) na cicatrização de defeito ósseo experimental como alternativa aos métodos convencionais, analisando-se o tempo de evolução cicatricial e a presença dessas células no tecido neoformado. O estudo concluiu que a terapia celular utilizada, isoladamente ou associada à rhBMP-2, induz à cicatrização óssea mais rápida da tíbia em defeitos experimentais de cães. Treichel et al. (33) avaliaram o efeito do transplante de fração total de CM da MO ou FVE do tecido adiposo associado à membrana celulósica em ferida cutânea experimental de coelhos. Ao final do período de avaliação, os grupos tratados apresentaram diferença estatística significativa da área da ferida em relação ao grupo controle e o grupo que recebeu a FVE do tecido adiposo apresentou o menor tempo de cicatrização da ferida. Pelo estabelecimento do



cultivo as células mesenquimais obtidas são congeladas em meio de congelamento constituído de DMSO a 10% em SFB e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  ou em nitrogênio líquido, possibilitando a formação de banco de células para posterior utilização. A viabilidade observada após o descongelamento pela exclusão do azul de trypan foi acima de 90%.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As MSCs encontram-se atualmente como a nova promessa na terapia contra diversos tipos de doenças, sejam elas congênicas/hereditárias ou adquiridas, em animais e seres humanos. Os resultados obtidos de pesquisas realizadas, utilizando as frações totais de células da MO e TA, demonstram a possibilidade de utilização de células de diferentes tecidos, uma vez que essas células são passíveis de adaptação ao cultivo, expansão e armazenagem. A padronização de técnicas para o processamento, identificação e caracterização dessas células permitirá o desenvolvimento de ensaios clínicos de forma que seja possível definir com segurança suas indicações e eficácia em pacientes.

## REFERÊNCIAS

1. Del Carlo RJ, Monteiro BS, Argolo Neto NM. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. *Rev Ceres*. 2009;56(4):446-50.
2. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1964;51(1): 29-36.
3. Drzewiecki BA, Thomas JC, Tanaka ST. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: current and future applications in the urinary bladder. *Stem Cells Int*. 2010 Jan 3;2010:765167. doi:10.4061/2010/765167.
4. Torres FC. Panículo adiposo interescapular de coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como fonte de células-tronco [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.
5. Monteiro BS, Argolo Neto NM, Del Carlo RJ. Células-tronco mesenquimais. *Cienc Rural*. 2010;40(1):238-45.
6. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch*. 2009;76(2):56-66.
7. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(1):25-35.
8. Teixeira MW, Rezende CMF. Imunossupressão e transplantes: perspectivas atuais e futuras. *Medvep: Rev Cient Med Vet Pequenos Anim Anim Estim*. 2004;2(7):205-10.
9. Tharasanit T, Phutikanit N, Wangdee C, Soontornvipart K, Tantrajak S, Kaewamatawong T, et al. Differentiation potentials of canine bone marrow mesenchymal stem cells. *Thai J Vet Med*. 2011;41(1):79-86.
10. Semedo P, Costa MC, Cenedeze MA, Malheiros DMAC, Shimizu MHM, Seguro AC, et al. Papel imunossupressor e remodelador das células-tronco mesenquimais em um modelo experimental de doença renal crônica. *Einstein*. 2009;7(4):469-79.

11. Casteilla L, Benard VP, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells*. 2011;3(4):25-33.
12. Silva CL. Estudos moleculares de células-tronco mesenquimais cultivadas in vitro [tese]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer; 2009.
13. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell. *Blood*. 2005;105(4):1815-22.
14. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007;262(5):509-25.
15. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005;54(3):132-41.
16. Zhang Y, Kropp BP, Lin HK, Cowan R, Cheng EY. Bladder regeneration with cell-seeded small intestinal submucosa. *Tissue Eng*. 2004;10(1/2):181-7.
17. Zhang Y, Lin HK, Frimberger D, Epstein RB, Kropp BP. Growth of bone marrow stromal cells on small intestinal submucosa: an alternative cell source for tissue engineered bladder. *Bju Int*. 2005;96(7):1120-5.
18. Kuo T, Lin H, Yang K, Lin F, Chen M, Wu C, et al. Bone marrow combined with dental bud cells promotes tooth regeneration in miniature pig model. *Artif Organs*. 2010;35(2):113-21.
19. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
20. Jack GS, Zhang R, Lee M, Xu Y, Wu B, Rodríguez LV. Urinary bladder smooth muscle engineered from adipose stem cells and a three dimensional synthetic composite. *Biomaterials* 2009;30(19):3259-70.
21. D'aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*. 2008;4(1):21-6.
22. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81(8):531-5.
23. Dissanayaka WL, Zhu X, Zhang C, Jin L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. *J Endod*. 2011;37(8):1074-80.
24. Patricio LFL. Isolamento, cultivo e diferenciação de células-tronco mesenquimais de cães [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.
25. Maciel BB. Isolamento, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de gato [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.

26. Fadel L. Caracterização morfológica das células-tronco mesenquimais de sangue umbilical e de tecido adiposo coletadas por via intra-abdominal e uterina em ovinos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2009.
27. Tapp H, Hanley Jr. EN, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med.* 2009;234(1):1-9.
28. Seo MS, Jeong YH, Park JR, Park SB, Rho KH, Kim HS, et al. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci.* 2009;10(3):181-7.
29. Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119:2204-13.
30. Colomé LM, Gomes C, Crosignani N, Paz AH, Lugo AA, Guimarães KM, et al. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. *Cienc Rural.* 2008;38(9):2529-34.
31. Fontes EB. Hidroxiapatita sintética associada ou não à fração total de células mononucleares na regeneração de osso alveolar de cães [dissertação]. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria; 2009.
32. Oliveira GK, Raiser AG, Olsson D, Salbego FZ, Martins DB, Dezengrine R, et al. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2010;62(1):72-9.
33. Treichel TLE, Cunha MGMCM, Cunha JPCM, Santos Júnior EB, Leme Júnior PTO, Costa MM, et al. Transplante de fração total de células mononucleares ou fração vascular estromal associada à membrana celulósica em feridas cutâneas experimentais de coelhos. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2011;48(1):62-72.

**Recebido em: 12/01/13**

**Aceito em: 13/02/13**

## IMUNODEFICIÊNCIAS PRIMÁRIAS EM EQUINOS

M. Julia B. Felipe<sup>1</sup>

### RESUMO

As imunodeficiências são doenças raras em equinos e podem ser fatais. A falha em um ou mais aspectos do sistema imunitário pode causar infecções e febre recorrentes; além disso, infecções por organismos oportunistas é uma característica clínica importante desta condição. As imunodeficiências podem ser primárias a disfunções genéticas ou secundárias a desordens virais, metabólicas, endócrinas ou nutricionais. Entre as imunodeficiências primárias, as mais comuns envolvem o sistema humoral e afetam a produção de anticorpos; as deficiências celulares são mais difíceis de diagnosticar e, portanto, menos compreendidas. As imunodeficiências primárias geralmente se manifestam na idade jovem, principalmente quando a proteção com anticorpos maternos se reduz ao redor dos 2 a 3 meses de idade. Além disso, no potro, o sistema imune se desenvolve gradativamente com a idade e exposição aos organismos ambientais; neste período, portanto, há uma susceptibilidade natural a infecções até que competência e memória imunológica são atingidas. Este trabalho descreve as condições de imunodeficiências primárias reportadas em equinos.

**Palavras-chave:** imunodeficiências, infecções recorrentes, equinos

### PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES IN HORSES

#### ABSTRACT

Immunodeficiencies are rare in horses and can be fatal. Failure to one or more aspects of the immune system can cause recurrent infections and fever; in addition, infections by opportunistic organisms are an important clinical feature of this condition. The primary immunodeficiencies may be caused by genetic defects, and the secondary immunodeficiencies can be due to viral, metabolic, endocrine or nutritional disorders. Among the primary immunodeficiencies, the most common involve the humoral system and affect antibody production; cellular deficiencies are more difficult to diagnose and, therefore, less understood. Primary immunodeficiencies usually manifest in early age, when the protective maternal antibodies are reduced around 2 to 3 months of age. Furthermore, in the foal, the immune system develops gradually with age and exposure to environmental organisms; therefore, in this period, there is a natural susceptibility to infections until immunocompetence and memory are achieved. This paper describes the conditions of primary immunodeficiencies reported in horses.

**Keywords:** immunodeficiency, recurrent infections, equine

### INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS EN EQUINOS

#### RESUMEN

Inmunodeficiencias son raras en equinos y puede ser fatal. La falta de uno o más aspectos del sistema inmune puede causar infecciones recurrentes y fiebre; además, las infecciones por organismos oportunistas son una característica clínica importante de esta condición. Las inmunodeficiencias primarias pueden ocurrir por disfunciones genéticas, mientras las inmunodeficiencias secundarias por trastornos viral, metabólico, endocrino o nutricional. Entre las inmunodeficiencias primarias, la más común son relacionadas con el sistema humoral y afectan la producción de anticuerpos; deficiencias celulares son más difíciles de diagnosticar y por lo tanto menos entendidas. Las inmunodeficiencias primarias suelen manifestarse en edades tempranas, sobre todo cuando los anticuerpos maternos protectores se reducen alrededor de 2 a 3 meses de edad. Por otra parte, en el potro, el sistema inmune se

<sup>1</sup> Associate Professor of Medicine Cornell University College of Veterinary Medicine Ithaca, Y 14882 mbf6@cornell.edu

desarrolla gradualmente con la edad y a la exposición a organismos ambientales; en este período, entonces hay una susceptibilidad natural a infecciones hasta que la competencia y la memoria inmune se ven afectados. En este trabajo, se describen las condiciones de las inmunodeficiencias primarias reportados en equinos.

**Palabras clave:** inmunodeficiencias, infecciones recurrentes, equinos

## INTRODUÇÃO

A imunodeficiência é uma doença do sistema imunitário que resulta em falha na proteção contra agentes patogênicos. Os indicadores clínicos de imunodeficiência são infecções e febre recorrentes e a infecção por organismos oportunistas. Em muitos casos, melhora clínica inicial pode ser observada com a terapia antimicrobiana; no entanto, os sinais de infecção tendem a reaparecer após o tratamento. Os sistemas mais susceptíveis à infecção são aqueles prontamente expostos a agentes patogênicos, incluindo os tratos respiratórios superior e inferior, o trato intestinal e a pele. Septicemia é uma consequência importante nesta condição e pode ser fatal.

As imunodeficiências são classificadas em primária e secundária. As imunodeficiências primárias podem envolver um defeito genético e são mais propensas a se manifestar em idade jovem, particularmente quando as concentrações de anticorpos colostrais chegam a níveis baixos. A causa de muitas imunodeficiências primárias é desconhecida ou são relacionadas ao desenvolvimento do sistema imune na idade jovem. Alguns distúrbios podem não ter padrão de hereditariedade definido e podem ser encontrados em indivíduos isolados ou em vários indivíduos de uma linhagem. O prognóstico para imunodeficiências primárias de origem genética é severo e fatal na maioria dos casos. As imunodeficiências secundárias podem ser adquiridas após tratamento imunossupressor (esteróides, por exemplo), determinadas doenças virais, perturbações do tecido linfóide primário ou secundário (infiltração tumoral), estresse, condições metabólicas/endócrinas (ex: hipercortisolemia) ou má nutrição. As imunodeficiências secundárias podem ser transitórias ou crônicas.

Neste artigo, abordaremos as imunodeficiências primárias. Em geral, as imunodeficiências podem afetar os diferentes elementos do sistema imune: a) as células B (imunodeficiência humoral); b) as células T (imunodeficiência celular); c) células B e T ao mesmo tempo (imunodeficiência severa combinada); d) os fagócitos; ou e) os fatores de complemento (1-3). Independentemente da causa, infecções recorrentes e febres são comuns a todos os tipos de imunodeficiência. No entanto, os tipos de organismos isolados dos locais de infecção podem indicar qual aspecto do sistema imune está sendo afetado devido ao oportunismo. Por exemplo, infecções com bactérias encapsuladas são associadas a deficiências humorais, enquanto que a identificação de agentes patogênicos intracelulares sugere um distúrbio celular.

### Imunodeficiências humorais

A hipogamaglobulinemia é a imunodeficiência mais frequentemente diagnosticada em mamíferos. A hipogamaglobulinemia do tipo IgG é a que mais causa susceptibilidade a infecções, enquanto que a hipogamaglobulinemia do tipo IgA pode não acarretar em susceptibilidade imune. Em imunodeficiências humorais, as células produtoras de anticorpos podem não se desenvolver adequadamente (resultando em linfopenia de células B), ou apresentar anomalias de função ou diferenciação em plasmócitos (números normais ou subnormais de células B). Em ambos os casos, a produção inadequada de imunoglobulinas favorece infecções recorrentes graves causadas por microorganismos oportunistas ou bactérias encapsuladas, já que a opsonização por anticorpos e complemento é essencial para fagocitose e eliminação destes agentes.

Distúrbios humorais descritos no potro e no equino jovem incluem falência na transferência passiva de imunoglobulinas pelo colostro, a hipogamaglobulinemia transitória, agamaglobulinemia e a deficiência seletiva de IgM. A imunodeficiência comum variável não foi ainda descrita em potros, embora sua manifestação na vida jovem é possível. A síndrome de anemia e imunodeficiência do potro ocorre nas raças Fell Pony e Dales, e possivelmente em linhagens co-sanguíneas. A imunodeficiência severa combinada, que inclui um componente humoral, ocorre em potros da raça ou linhagem Árabe. Em recém-nascidos e potros desmamados, o reconhecimento clínico de uma imunodeficiência primária é muitas vezes confundido com a apresentação comum de doenças

infecciosas nesta idade, muitas vezes envolvendo falência na transferência passiva de imunoglobulinas pelo colostro e o desenvolvimento fisiológico tardio do sistema imunitário. Independente da etiologia, potros com imunodeficiência primária deixam de ganhar peso e crescer adequadamente, apresentam infecções recorrentes (diarréia, pneumonia, osteomielite, meningite) por vários meses, ou infecções com organismos oportunistas (ex: *Cryptosporidium parvum*, *Pneumocystis jiroveci*, *Candida* spp., adenovírus) (4, 5). Além disso, alguns tipos de imunodeficiências são auto-limitadas, como a hipogamaglobulinemia transitória e a linfopenia T CD4 transitória; nestes casos, a terapia de suporte, incluindo antibióticos e transfusão de plasma por via intravenosa ajudam a controlar as infecções durante o período de instabilidade imunológica.

#### Falência na transferência passiva de imunoglobulinas colostrais

A placenta epiteliocorial dos equinos não permite a transferência de imunoglobulinas maternas para o feto durante a gestação. Por causa da falta de estímulo imunogênico no útero, o potro nasce com níveis muito baixos de anticorpos no sangue. O colostro secretado nas primeiras 12 horas após o parto é rico em IgG e pobre em IgM e IgA, enquanto o leite produzido a seguir mantém os níveis de IgA para a proteção da mucosa intestinal (6, 7). O pico de absorção de imunoglobulinas IgG colostrais ocorre ao redor das primeiras 8 horas após o parto e diminui rapidamente nas primeiras 24 horas de vida. As células epiteliais intestinais especializadas na absorção de IgG no potro são substituídas neste período por células maduras que não mais possuem a propriedade de absorção. Níveis sanguíneos de IgG acima de 800 mg/dL podem ser medidos no potro sadio ao redor das 12 horas de vida quando a absorção de IgG colostrais é eficiente, assegurando o sucesso de transferência passiva de imunoglobulinas colostrais.

Falência na transferência passiva é caracterizada por níveis séricos de IgG no potro menores de 800 mg/dL, de 18 a 24 horas após o nascimento, e valores entre 400 e 800 mg/dL são considerados falência parcial. Os métodos disponíveis para a medição de imunoglobulinas séricas variam de acordo com a sensibilidade e especificidade: coagulação de glutaraldeído, teste de turbidez de sulfato de zinco, teste de aglutinação de látex, e o teste SNAP ELISA (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, MN). Este último é amplamente utilizado na prática com moderada sensibilidade e alta especificidade, em comparação com o teste de imunodifusão radial que é considerado padrão.

Apesar do neonato equino ser imunocompetente ao nascer, a resposta humoral primária requer pelo menos 2 ou 3 semanas para ser estabelecida e este período favorece a invasão microbiana e doenças. Portanto, a transferência de anticorpos maternos desempenha um papel essencial no controle de infecções neste período de vida, incluindo funções de opsonização e fagocítica eficientes. A persistência de anticorpos maternos no potro é proporcional à quantidade de imunoglobulina colostrais absorvida, com uma meia-vida de 28 a 32 dias (8). Potros que mamam colostro de fêmeas vacinadas no último mês de gravidez têm concentrações séricas de IgG mais altas e prolongadas em comparação com potros de éguas não vacinadas. Em geral, o nível de IgG colostrais absorvido diminui e a concentração de IgG de produção endógena aumenta ao redor de 8 a 12 semanas de vida. Durante este período de transição, a concentração de IgG total no sangue do potro é geralmente baixa, ao redor de 500 a 800 mg/dL, causando um período de susceptibilidade a doenças infecciosas.

A incidência da falência total ou parcial de transferência passiva de imunoglobulinas colostrais em potros em fazendas de bom manejo é de 3 a 17% e envolvem fatores maternos e/ou do potro: baixa concentração de imunoglobulina no colostro, perda de colostro no período pré-parto (ex: em placentites), ingestão de quantidade inadequada de colostro, demora na ingestão de colostro e absorção inadequada de imunoglobulina colostrais mesmo quando mamando (ex: prematuridade, septicemia perinatal, hipoxemia perinatal, desenvolvimento inadequado do epitélio intestinal). Cerca de 78% dos potros com falha de transferência passiva adoecem com organismos infecciosos, mas uma pequena porcentagem desses potros resiste a doença. É possível que o sistema imune inato, juntamente com a transferência parcial de anticorpo materno, é capaz de proporcionar proteção imunitária quando a pressão ambiental com organismos infecciosos é baixa. Transfusão intravenosa de plasma é um meio eficiente de transferência passiva de imunoglobulinas para o potro após o período de capacidade de absorção (mais do que 24 horas de vida) e em potros com septicemia. Em geral, 1 litro de plasma é o suficiente para corrigir os níveis de imunoglobulinas séricas no potro para acima de 800 mg/dL e aumentar a capacidade de opsonização. No entanto, os potros com septicemia comumente necessitam de doses adicionais. Administração intravenosa de plasma deve usar equipo próprio para transfusão de

produtos de sangue (ex: equipo com filtro), e executada lentamente nos primeiros 15 minutos para avaliar possíveis reações anafiláticas (ex: piloereção, taquicardia, tremores musculares).

#### Hipogamaglobulinemia transitória do equino jovem

A hipogamaglobulinemia transitória é resultante do atraso na produção de IgG na idade jovem (9). Potros saudáveis produzem IgG específica a antígenos imediatamente após o nascimento, e níveis de anticorpos endógenos chegam a mais de 500 mg/dL ao redor de 5 a 8 semanas de vida. Com o atraso nesta produção, o potro se coloca em risco a infecções e doenças, particularmente quando as concentrações de IgG colostrais caem abaixo 400 mg/dL. As concentrações séricas de IgG e IgG (T) são baixas, enquanto que IgM e IgA podem ser normais ou diminuídas. Em geral, esta condição melhora ao redor dos 8 meses de vida, mas pode se prolongar pelos primeiros 18 meses de vida. A resposta humoral a vacinação é inadequada durante este período. As terapias com antibióticos e transfusão intravenosa de plasma são essenciais durante esta fase e a recuperação dos níveis de IgG sérico em idade mais avançada indica a qualidade transitória desta condição. A hipogamaglobulinemia transitória ocorre em várias raças de cavalos, e pode ser mais freqüente do que o relatado, já que a medição de IgG sérico em potros acima de 2 meses de vida é infrequente. Portanto, em potros com infecções recorrentes nessa idade, a quantificação da concentração sérica de IgG é aconselhada.

A causa do atraso na produção de imunoglobulinas é desconhecido e, talvez, envolve a interação coordenada entre células que apresentam antígenos, células T CD4+ (helper) e células B em tecidos linfóides secundários, para a ativação e expansão de linfócitos. Nestes potros, a distribuição de linfócitos B e T no sangue periférico é geralmente normal e a resposta proliferativa ao estímulo mitogênico in vivo (pele) e in vitro são normais (9). No entanto, alguns potros apresentam linfopenia de células T CD4+ junto com a hipogamaglobulinemia, um achado que pode sugerir a falta de estímulo das células T CD4+ para a diferenciação e função de células B. A concentração sérica de IgM abaixo de 50 mg/dL concomitante com a hipogamaglobulinemia de IgG sugere uma disfunção humoral relacionada com a função ou diferenciação das células B.

#### Agamaglobulinemia

Agamaglobulinemia equina é uma doença primária rara e fatal no potro macho causada por desenvolvimento inadequado de células B, levando a ausência na produção de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA e infecções recorrentes em idade jovem (febre, pneumonia, rinite, artrite), com morte ao redor dos 18 meses de vida (10, 11). A imunodeficiência é detectada clinicamente quando as concentrações de imunoglobulinas colostrais diminuem (ao redor dos 3 meses de vida), mas os potros já nascem com linfopenia B e falta de células plasmáticas e não conseguem aumentar as concentrações séricas de IgM, IgG e IgA com o tempo (12).

A doença se manifesta em equinos machos jovens e apresenta características semelhantes a agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X (XLA) descrito em pacientes humanos do sexo masculino. Nos seres humanos, a doença é causada por uma mutação do gene que codifica a tirosina quinase de Bruton (BTK). A proteína citoplásmica BTK sustenta sinalização e ativação de transcrição em células B após ativação do receptor de imunoglobulina celular, e sua disfunção previne a diferenciação de células B. O gene *BTK* humano está localizado no cromossoma X, daí a manifestação da doença em pacientes do sexo masculino. O envolvimento do gene *BTK* em agamaglobulinemia de equinos não foi confirmado até o momento, o que seria essencial para o diagnóstico definitivo da doença.

A contagem de linfócitos em sangue periférico e função das células T são normais e estas repondem com proliferação ao estímulo mitogênico. O desenvolvimento inadequado de células B leva a sua ausência no sangue periférico, ausência de folículos linfóides, centros germinativos e células plasmáticas. O estado agamaglobulinêmico é irreversível e os potros não respondem à vacinação com a produção de anticorpos. Em contraste com a imunodeficiência combinada severa (SCID) e a síndrome de imunodeficiência do potro, potros com agamaglobulinemia conseguem sobreviver com o tratamento antimicrobiano por vários meses devido a resposta funcional das células T. Um diagnóstico diferencial importante é imunodeficiência comum variável (CVID). Embora não tenha sido diagnosticada em potros ainda, CVID em equinos se manifesta em ambos os sexos com infecções bacterianas recorrentes, hipo ou agamaglobulinemia, resposta inadequada a vacinação, linfopenia de células B, e falta dos centros germinais e células plasmáticas nos tecidos linfóides (13).

### Deficiência seletiva de imunoglobulina IgM

A deficiência seletiva de IgM foi diagnosticada em potros de ambos os sexos da raça Árabe, Quarto de Milha e Standardbred, na idade de 2 a 10 meses (14-17). Os potros apresentavam história clínica com febres recorrentes, broncopneumonia crônica, artrite, enterite, dermatite, hiperplasia de linfonodos e crescimento retardado. Os micro-organismos isolados do trato respiratório dos potros afetados incluem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Actinobacillus equuli*, *Klebsiella* spp, e *E. coli*. Em potros, infecções crônicas acabam levando a eutanásia, embora as condições transitórias são possíveis. As concentrações séricas de IgM mediram menos do que 2 desvios-padrão da média normal, sendo que as de IgG e IgA se encontravam dentro da faixa normal de referência para a idade. As contagens de linfócitos B e T em sangue periférico e a resposta proliferativa ao estímulo mitogênico in vitro foi medida com resultados normais, embora a resposta para lipopolissacarídeo pareceu ser diminuída nos animais afetados (18).

A interpretação das concentrações séricas de IgM, deve ser feita com cautela, especialmente quando as concentrações séricas de IgG e IgA estão dentro dos valores normais; concentrações séricas de IgM menor do que 25 mg/dL persistentes definem esta disfunção humoral (19). As concentrações séricas de IgM são bastante específicas para a função das células B em potros, já que a produção de IgM ocorre no útero, a concentração de IgM colostrar é baixa e tem uma meia-vida curta de 5-16 dias (8, 16, 20). Concentrações séricas de IgG e IgM devem ser monitorizadas para avaliar a persistência ou a alteração dos valores com a idade. Quando as concentrações séricas de IgM menores do que 25 mg/dl são acompanhadas por hipogamaglobulinemia IgG e linfopenia de células B, outros tipos de imunodeficiência humoral devem ser considerados (ex: agamaglobulinemia, imunodeficiência variável comum). Linfoma ou linfossarcoma devem ser considerados como diagnóstico diferencial pois muitas vezes causam hipogamaglobulinemia IgM.

O fato da concentração sérica de IgM ser seletivamente baixa concomitantemente à concentração sérica normal de IgG é intrigante. Todas as células B produzidas na medula óssea expressam IgM, e podem gerar a resposta IgM primária ao encontrar com antígenos. A resposta de IgG requer a interação com células T CD4+ e a troca de isotipo de imunoglobulina, um processo que requer ativação e co-estimulação celular. Portanto, o fato de que IgG é produzido, mas não o seu antecessor IgM traz questões importantes sobre o mecanismo da doença. Além disso, o tipo de organismo isolado em potros afetados requer opsonização com IgG e complemento para fagocitose e destruição eficiente, enquanto que IgM tem um papel reduzido neste processo. Uma base genética não foi identificada, mas dois casos relatados tinham uma linhagem comum (15).

### Síndrome da imunodeficiência do potro

A síndrome da imunodeficiência do potro (foal immunodeficiency syndrome, FIS) é uma condição hereditária fatal caracterizada por anemia profunda e septicemia, esta última devido à imunodeficiência primária. A doença afeta potros machos e fêmeas das raças Fell Pony e Dales, e possivelmente outros animais com estas linhagens sanguíneas (21, 22). Potros afetados nascem aparentemente saudáveis, mas rapidamente deixam de prosperar e são submetidos à eutanásia. A doença se torna clinicamente aparente em potros ao redor de um mês de vida e a morte ocorre geralmente ao redor dos três meses de vida (23-25). Enterocolite, broncopneumonia, pancreatite e hiperqueratose glossal são freqüentemente causadas por infecções oportunistas (ex: *Escherichia coli*, *Cryptosporidium* spp., adenovírus) que caracterizam a susceptibilidade imune. O tratamento de infecções e septicemia pode ser temporariamente possível com antibióticos, no entanto, a combinação de organismos infecciosos impede uma proteção prolongada. A anemia é fatal.

Os potros desenvolvem anemia progressiva severa pela falta de produção de eritrócitos na medula óssea, anemia do tipo não-regenerativa que não envolve hemorragia ou hemolysis (23-25). A citologia de medula óssea de potros afetados indica que estes podem nascer com precursores eritróides, mas rapidamente desenvolvem hipoplasia eritrocitária severa. Além disso, desenvolvem a linfopenia de células B e há hipoplasia dos órgãos linfóides, com falta de folículos germinativos secundários nos linfonodos e baço e ausência de plasmócitos. O exame imunoistoquímico não detecta linfócitos B na medula óssea e estas são raras nos linfonodos e baço. A ganglionopatia periférica caracterizada por cromatólise neuronal envolvendo gânglios mesentérico e trigêmeo craniano também foi descrita (23).



Ao nascimento, os valores de hemoglobina e hematócrito podem ser medidos dentro dos níveis baixos de referência, e a distribuição de células B no sangue periférico são equivalentes aos dos potros não afetados. Mas em poucas semanas, anemia profunda e linfopenia de células B desenvolvem (26-28). Embora a linfopenia B limita a capacidade dos potros afetados em produzir imunoglobulinas, as concentrações séricas de IgG são geralmente normais quando os sinais clínicos são detectadas, pois são ainda de origem colostrar (23-25, 29). No entanto, as concentrações séricas de IgM não são detectáveis em potros afetados, um parâmetro não confundido por anticorpos colostrais nesta idade e que indica a imunodeficiência humoral (7, 26, 29). Os potros afetados desenvolvem septicemia apesar de concentrações séricas de IgG normais, sugerindo uma disfunção linfocítica mais ampla. Embora há distribuição sanguínea normal de células T CD4 + e CD8 + em potros afetados, uma possível disfunção de células T é sugerida pelo desenvolvimento anormal do timo e infecções oportunistas com criptosporídeos e adenovirus (27). Além disso, a expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC classe II) em linfócitos do sangue periférico pode ser reduzida e/ou não aumentar com a idade em potros afetados, também sugerindo desenvolvimento anormal de linfócitos T (30). No entanto, quando estimulados *in vitro*, os linfócitos de sangue periférico de potros afetados respondem normalmente a mitógenos (25, 27).

A análise do pedigree da raça Fell Pony sugere que esta síndrome tem herança autossômica recessiva (22, 23). Os carreadores genéticos são fenotipicamente normais. Uma mutação no gene SLC5A3 no cromossomo ECA26 foi associado a síndrome (31). O efeito biológico e a relação causal desta mutação não foram definidos até o presente e outras mutações na região genômica podem estar envolvidas. A presença de eritrócitos e células B no sangue periférico no momento do nascimento sugere uma hematopoiese limitada durante a vida fetal. No entanto, esta produção de células não é mantida após o nascimento. Esta condição hereditária pode ser causada por anomalias genéticas independentes ou comuns que afetam ambas as linhas celulares. Um teste genético de DNA foi desenvolvido pelo Animal Health Trust, Newmarket, UK (22) que detecta animais carreadores e afetados, favorecendo o planejamento reprodutivo e, conseqüentemente, diminuindo a incidência desta síndrome.

#### Imunodeficiência comum variável

A imunodeficiência comum variável (common variable immunodeficiency, CVID) é uma doença imunológica rara e fatal no equino caracterizada pela manifestação clínica tardia de infecções bacterianas recorrentes devido à falência na produção de anticorpos secundária à diferenciação ineficiente das células B na medula óssea. A maioria dos animais afetados têm uma vida saudável por vários anos até que os sinais clínicos da doença se manifestam com infecções bacterianas e febres recorrentes, hipo ou agamaglobulinemia, linfopenia progressiva de células B e resposta inadequada à vacinação (ex: toxóide tetânico) (32).

Os animais afetados são equinos adultos (idade média de 10 anos, entre 2 a 23 anos), de ambos os sexos, não co-sanguíneos e raças e linhagens diferentes (Puro Sangue Inglês, Quarto de Milha, Árabe, Warmblood, Paint e Pony) (13). Os sinais clínicos mais comuns incluem pneumonia recorrente, sinusite, meningite e/ou distúrbios neurológicos, septicemia, peritonite, gengivite, hepatite, diarreia, susceptibilidade a parasitas gastrointestinais, conjuntivite, uveíte e abscessos de pele (32-35). A meningite bacteriana, doença rara no equino adulto, pode apresentar-se clinicamente com depressão e anorexia acentuada, alternada por períodos de apetite normal e ataxia. A perda de peso e/ou atrofia muscular são comuns.

A imunofenotipagem de linfócitos do sangue periférico indica linfopenia de células B persistente e severa (inferior a 2%). O parâmetro que definitivamente indica uma disfunção humoral é a concentração sérica de IgG menor do que 800 mg/dL. As concentrações séricas de IgM são também reduzidas a menos do que 25 mg/dL, o que sugere a incapacidade de elaborar a resposta imune primária e secundária e a disfunção das células B. As concentrações séricas de IgA podem estar dentro dos valores normais, mas os níveis tendem a reduzir progressivamente. A hipogamaglobulinemia severa leva à hipoglobulinemia, mesmo na presença de infecções bacterianas graves e hiperfibrinogenemia (36).

Os agentes patogênicos envolvidos em infecções são *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Actinobacillus* spp., e *Klebsiella* spp., organismos que requerem a opsonização com imunoglobulina e complemento para a fagocitose e destruição bacteriana eficientes. Algumas vezes, infecção por fungos

(*Aspergillus* spp., *Bipolaris* spp, *Pneumocystis jiroveci*) ou *Rhodococcus equi* foi diagnosticada em um pequeno número de equinos afetados que foram tratados com corticóides, ou apresentaram linfopenia de células T CD4 + e razão de células CD4/CD8 baixa, concomitantemente à linfopenia de células B (1, 13). Linfopenia intermitente (<1,200 células /ml) é comum. No entanto, a resposta das células T ao estímulo mitogênico *in vitro* é normal.

As células B são raras nos tecidos linfóides primários e secundários e, conseqüentemente, no sangue periférico (13, 36). Em geral, os linfonodos são pequenos e não apresentam centros de germinação secundário. Além disso, há ausência de células plasmáticas em vários tecidos linfóides e mucosas. As células B precisam ser geradas a partir de células-tronco hematopoéticas na medula óssea continuamente ao longo da vida de um indivíduo para manter a população celular e função humoral adequada nos tecidos linfóides periféricos. A diferenciação e desenvolvimento de células B são reguladas por uma rede de elementos de transcrição e de desmetilação de dinucleótidos (37). Nos animais afetados, a produção de células B não se completa na medula óssea e a anomalia afeta a fase de transição entre células pré-pró-B e células pró-B. Há diminuição significativa na expressão dos fatores de transcrição E2A e PAX5, o que afeta a expressão subsequente dos genes *CD19*, *IGHM* e *IGHD*, todos essenciais para a produção de células B (38). Os estudos atuais investigam a possibilidade de mecanismos epigenéticos que levam à silenciamento de genes essenciais para diferenciação das células B na medula óssea.

O manejo clínico de animais afetados requer terapia antimicrobiana constante ou intermitente, além de terapia de suporte durante septicemia e infecções severas. Transfusão intravenosa de plasma equino não é viável devido a baixa concentração de imunoglobulinas, vida-média curta e alto custo. Portanto, a maioria dos animais afetados são submetidos a eutanásia. O principal diagnóstico diferencial é linfoma ou linfosarcoma porque podem alterar a distribuição e função de linfócitos, incluindo linfopenia de células B e hipogamaglobulinemia. Se a doença se manifesta em idade jovem, outros diagnósticos diferenciais incluem hipogamaglobulinemia transitória do equino jovem e agamaglobulinemia.

### **Imunodeficiências celulares**

Doenças primárias da imunidade celular são raras e mais difíceis de diagnosticar do que as imunodeficiências humorais. Elas podem resultar da disfunção celular devido a falhas na expressão de moléculas de superfície envolvidas na ativação celular, ou dos componentes celulares de sinalização. No entanto, condições que afetam a distribuição das células T no sangue periférico podem ser reconhecidas por testes imunológicos como a imunofenotipagem. Os sinais clínicos de infecções recorrentes e febres são comuns tanto na imunidade celular quanto a humoral. No entanto, o tipo de organismo que causa a doença (ex: organismos intracelulares como vírus, fungos, protozoários e micobactérias) sugere o envolvimento de deficiência na imunidade celular.

#### Linfopenia transitória de células T CD4+

Proporcionalmente ao avanço na idade, o potro apresenta um aumento nas contagens totais de linfócitos do sangue periférico e peso dos tecidos linfóides secundários e ambos refletem a ativação e expansão de linfócitos nesta fase de estímulo antigênico intenso (39). Alguns potros, no entanto, podem apresentar um atraso nesta expansão populacional, e apresentarem valores baixos de linfócitos T CD4+ no sangue periférico e, conseqüentemente, baixa razão CD4/CD8 (menor do que 2) de distribuição de células T (40, 41). A expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II em linfócitos aumenta fisiologicamente no potro no primeiro ano de vida. Nos potros afetados, há um atraso neste processo nos linfócitos, mas não nos monócitos. A resposta proliferativa de linfócitos ao estímulo mitogênico *in vitro*, as concentrações séricas de imunoglobulina e a distribuição de linfócitos B são normais em potros afetados. No entanto, alguns potros podem apresentar também hipogamaglobulinemia transitente.

Potros normais em crescimento tendem a ter uma concentração de linfócitos superior (2 ou 3 vezes) à do cavalo adulto. A redução na população de células T CD4+ no sangue periférico é acompanhada frequentemente por linfopenia absoluta ou falha na expansão da população linfocítica. Em outros casos, a linfopenia de células T CD4+ pode ocorrer mesmo quando há uma expansão notável na contagem linfocítica. Ambas as condições podem ser medidas com o teste de imunofenotipagem, usando valores referências de animais saudáveis da mesma idade. Em alguns casos,

há uma porcentagem alta dos linfócitos circulantes negativos para os marcadores de células T (CD3, CD4, CD8) e B (CD19 e IgM); estas células podem ser células natural killer NK (39). É possível que a linfopenia CD4 transitória reflète uma atividade comprometida dos tecidos linfóides secundários, com baixa ativação e expansão celular.

Durante esta fase, pode haver aumento na susceptibilidade a infecções recorrentes por organismos intracelulares (ex: pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*) (40). Nos casos em que há concomitante hipogamaglobulinemia, a lista de organismos se expande a bactérias encapsuladas. A terapia antimicrobiana prolongada é recomendada até que os parâmetros se recuperem. No caso de *Pneumocystis jiroveci*, tratamento com trimetoprim-sulfadiazina controla as pneumonias recorrentes. Esses potros devem ser monitorizados periodicamente com leucogramas, ultra-som ou radiografia torácica e testes imunológicos para determinar a necessidade de tratamento de acordo com a melhoria dos valores clínicos e imunológicos.

### **Imunodeficiência combinada severa**

A imunodeficiência combinada severa (severe combined immunodeficiency, SCID) é uma condição hereditária autossômica recessiva que afeta o desenvolvimento de células B e T em potros da raça Árabe ou com sua linhagem (41-43). Consequentemente, tanto a imunidade humoral como a celular são prejudicadas, levando a susceptibilidade a infecções por organismos variados (44). A doença se manifesta clinicamente em potros machos e fêmeas de menos de dois meses de vida e que apresentam broncopneumonia e diarreia causadas por infecções bacterianas, *Pneumocystis jiroveci*, adenovírus, coronavírus e *Cryptosporidium parvum* (45, 46). Como as infecções são comuns nesta idade, o diagnóstico pode ser negligenciado inicialmente.

Os tecidos linfóides em potros afetados são hipoplásticos e não possuem centros germinativos. O timo tem escassez de linfócitos e é infiltrado por tecido adiposo (47). Consequentemente, há linfopenia severa em sangue periférico ( $< 1.000$  células/ $\mu$ L) e a concentração sérica de IgM não é detectável. A concentração sérica de IgG reflète os anticorpos colostrais ainda circulantes. Os poucos linfócitos existentes não são funcionais, não respondem à vacinação e ao estímulo mitogênico e alogênico, e não elaboram reação de hipersensibilidade retardada (48). No entanto, os potros afetados são susceptíveis a doença quando recebem sangue hepático, do timo ou periférico de cavalos não afetados (49).

O desenvolvimento anormal de células B e T é causado por um defeito na recombinação dos genes variável, diversificado e junta [V(D)J] durante a formação dos receptores B e T. Uma mutação silenciosa do gene que codifica a porção catalítica da DNA-dependente proteína quinase (DNA-PKC) resulta na ausência da função desta proteína em potros afetados (50, 51). Portanto, não há recombinação genética viável, os receptores não se formam e as células B e T não se desenvolvem. A manifestação da doença ocorre em potros homocigóticos para este gene defeituoso, enquanto que os cavalos carreadores heterocigóticos são imunocompetentes.

O tratamento de potros afetados é difícil e ineficiente (52). Terapia com antibióticos e transfusão de plasma intravenosa fornece um controle limitado das infecções, mas a morte ocorre antes dos cinco meses de idade. Substituição experimental bem sucedida de células B e T em potros afetados foi realizada experimentalmente com o transplante de medula óssea de um potro saudável de compatibilidade completa com seu irmão afetado (53). O transplante criou um sistema imunológico funcional no recipiente, caracterizado por número normal de linfócitos circulantes, resposta humoral à vacinação e resposta proliferativa à injeção mitogênica intradérmica.

O diagnóstico definitivo de carreadores e potros afetados pode ser feito laboratorialmente por teste de DNA usando amostras de sangue total ou swab de mucosa (54). O teste deve ser realizado em todos os cavalos árabes e árabe-mestiços utilizados em reprodução. O planejamento apropriado de reprodução de carreadores impede o resultado com potros afetados e diminui a incidência do gene mutante na população.

### **Imunodeficiências fagocíticas**

Não há nenhuma descrição de disfunção fagocitária primária no cavalo. Potros recém-nascidos saudáveis possuem função neutrofílica eficiente, mas uma diminuição transitória na fagocitose e a atividade oxidativa pode ser observada na septicemia, com melhora na eficiência durante o período de

recuperação clínica (55, 56). É importante lembrar que a função fagocítica depende da capacidade de opsonização, principalmente por imunoglobulinas e complemento (57).

A anomalia de Pelger-Hüet de neutrófilos foi identificada no equino, na qual as células apresentam núcleos em forma de haltere bilobado e com diminuição de segmentos nucleares (58, 59). A função destes neutrófilos competente, ou seja, a fagocitose e a atividade oxidativa são normais e não há sinais clínicos de imunodeficiência. Portanto, o diagnóstico é incidental, durante a avaliação de esfregaços de sangue. Nos seres humanos, a anomalia de Pelger-Hüet é benigna e herdada de forma dominante, causada por mutações no gene do receptor da lamina-B (RLB) durante a fase terminal de diferenciação dos neutrófilos.

Embora as formas hereditárias da disfunção dos neutrófilos não foram ainda descritas no cavalo, teste da função dos neutrófilos (expressão da molécula CD18, capacidade de fagocitose e atividade oxidativa) é indicada quando os sinais clínicos incluem dermatite recorrente ou abscessos cutâneos ou cavitários causados por bactérias oportunistas ou encapsuladas (*Serratia* spp., *Streptococcus* spp.), ou fungos (*Candida* spp., *Aspergillus* spp.). Algumas das doenças associadas com distúrbios fagocitárias descritas em outras espécies incluem deficiência de adesão de leucócitos (falta de expressão da integrina CD18), a doença granulomatosa crônica (incapacidade de atividade oxidativa), hematopoiese cíclica de neutrófilos e síndrome de Chediak-Higashi (grânulos gigantes em neutrófilos).

### **Imunodeficiências do sistema de complemento**

A deficiência primária de proteínas de complemento não foi ainda relatada no cavalo. No entanto, o potro nasce com baixas concentrações séricas de complemento e o colostro não é uma fonte significativa de componentes. Portanto, os potros são transitoriamente deficientes na capacidade de opsonização com complemento e contam com sua própria produção após o nascimento (55, 57). Em septicemia, complemento C3 é rapidamente consumido, o que atrasa o aumento fisiológico observado com a idade (56).

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As imunodeficiências primárias são raras nos equinos, mas esta espécie apresenta várias formas de doenças, algumas bem definidas geneticamente, outras ainda em estudo. Testes imunológicos para o diagnóstico de imunodeficiência são indicados quando há sinais clínicos de infecções e febres recorrentes, infecções com organismos oportunistas (ex: *Pneumocystis jiroveci*, *Cryptosporidium parvum*, adenovírus) ou história clínica de linhagem de sangue que sugere herança de disfunção imune primária. Imunodeficiência humoral pode ser diagnosticada inicialmente por concentrações séricas de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA e pela distribuição de células B no sangue periférico. Imunodeficiência celular é relativamente rara e mais difícil de diagnosticar, mas alterações na distribuição de células T no sangue periférico por imunofenotipagem e citometria de fluxo podem ser avaliadas. Além disso, a resposta proliferativa e a produção de citocinas de células T após estimulação mitogênica *in vitro* e a reação de hipersensibilidade retardada a injeção intradérmica são métodos que avaliam a função celular. Os testes para a função de fagocitose e atividade oxidativa em citometria de fluxo são práticos e eficientes.

Todos os testes imunológicos em potros devem ser acompanhados de amostras de controle pareadas por idade e raça, a fim de considerar aspectos de desenvolvimento no sistema imune na idade jovem. Os resultados devem ser ainda comparados com os intervalos de confiança determinado pelo laboratório. A repetição de testes é recomendada para avaliar uma condição transitória ou persistente. Em potros de menos de três meses de vida, os níveis séricos de IgG incluem anticorpos colostrais que confundem a interpretação de produção endógena. Por conseguinte, as concentrações séricas de IgM são mais específicas para medir a função das células B em potros (8, 15, 20). A resposta humoral a vacinação em potros pode também ser difícil de interpretar devido à interferência de anticorpos colostrais e a necessidade de um ou dois reforços antigênicos para alcançar uma resposta mensurável; desta forma, este tipo de teste tem uma aplicação mais definida em potros maiores de seis meses de vida.

**REFERÊNCIAS**

1. Riggs MW. Evaluation of foals with immune deficiency disorders. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1987;3:515-28.
2. Perryman LE. Primary immunodeficiencies of horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2000;16:105-16.
3. Giguere S, Polkes AC. Immunologic disorders in neonatal foals. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2005;21:241-72.
4. McClure JJ, Addison JD, Miller RI. Immunodeficiency manifested by oral candidiasis and bacterial septicemia in foals. *J Am Vet Med Assoc.* 1985;186:1195-7.
5. Tanaka S, Kaji Y, Taniyama H, Matsukawa K, Ochiai K, Itakura C. *Pneumocystis carinii* pneumonia in a thoroughbred foal. *J Vet Med Sci.* 1994;56:135-7.
6. Kohn CW, Knight D, Hueston W, Jacobs R, Reed SM. Colostral and serum IgG, IgA, and IgM concentrations in Standardbred mares and their foals at parturition. *J Am Vet Med Assoc.* 1989;195:64-8.
7. Lavoie JP, Spensley MS, Smith BP, Mihalyi J. Colostral volume and immunoglobulin G and M determinations in mares. *Am J Vet Res.* 1989;50:466-70.
8. Lavoie JP, Spensley MS, Smith BP, Mihalyi J. Absorption of bovine colostral immunoglobulins G and M in newborn foals. *Am J Vet Res.* 1989;50:1598-603.
9. McGuire TC, Poppie MJ, Banks KL. Hypogammaglobulinemia predisposing to infection in foals. *J Am Vet Med Assoc.* 1975;166:71-5.
10. McGuire TC, Banks KL, Evans DR, Poppie MJ. Agammaglobulinemia in a horse with evidence of functional T lymphocytes. *Am J Vet Res.* 1976;37:41-6.
11. Banks KL, McGuire TC, Jerrells TR. Absence of B lymphocytes in a horse with primary agammaglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol.* 1976;5:282-90.
12. Deem DA, Traver DS, Thacker HL, Perryman LE. Agammaglobulinemia in a horse. *J Am Vet Med Assoc.* 1979;17:469-72.
13. Flaminio MJ, Tallmadge R, Salles-Gomes CM, Matychak MB. Common variable immunodeficiency in horses is characterized by B cell depletion in primary and secondary lymphoid tissues. *J Clin Immunol.* 2009;29:107-16.
14. Perryman LE, McGuire TC, Hilbert BJ. Selective immunoglobulin M deficiency in foals. *J Am Vet Med Assoc.* 1977;170:212-5.
15. Perryman LE, McGuire TC. Evaluation for immune system failures in horses and ponies. *J Am Vet Med Assoc.* 1980;176:1374-7.
16. McGuire TC, Perryman LE, Davis WC. Analysis of serum and lymphocyte surface IgM of healthy and immunodeficient horses with monoclonal antibodies. *Am J Vet Res.* 1983;44:1284-8.

17. Boy MG, Zhang C, Antczak DF, Hamir AN, Whitlock RH. Unusual selective immunoglobulin deficiency in an Arabian foal. *J Vet Intern Med.* 1992;6:201-5.
18. Weldon AD, Zhang C, Antczak DF, Rebhun WC. Selective IgM deficiency and abnormal B-cell response in a foal. *J Am Vet Med Assoc.* 1992;201:1396-8.
19. Perkins GA, Nydam DV, Flaminio MJ, Ainsworth DM. Serum IgM concentrations in normal, fit horses and horses with lymphoma or other medical conditions. *J Vet Intern Med.* 2003;17:337-42.
20. Tallmadge RL, McLaughlin K, Secor E, Ruano D, Matychak MB, Flaminio MJ. Expression of essential B cell genes and immunoglobulin isotypes suggests active development and gene recombination during equine gestation. *Dev Comp Immunol.* 2009;33:1027-38.
21. Fox-Clipsham LY, Swinburne JE, Papoula-Pereira RI, Blunden AS, Malalana F, Knottenbelt DC, et al. Immunodeficiency/anaemia syndrome in a Dales pony. *Vet Rec.* 2009;165:289-90.
22. Fox-Clipsham LY, Brown EE, Carter SD, Swinburne JE. Population screening of endangered horse breeds for the foal immunodeficiency syndrome mutation. *Vet Rec.* 2001;169:655-8.
23. Scholes SF, Holliman A, May PD, Holmes MA. A syndrome of anaemia, immunodeficiency and peripheral ganglionopathy in Fell pony foals. *Vet Rec.* 1998;142:128-34.
24. Richards AJ, Kelly DF, Knottenbelt DC, Cheeseman MT, Dixon JB. Anaemia, diarrhoea and opportunistic infections in Fell ponies. *Equine Vet J.* 2000;32:386-91.
25. Gardner RB, Hart KA, Stokol T, Divers TJ, Flaminio MJ. Fell Pony syndrome in a pony in North America. *J Vet Intern Med.* 2006;20:198-203.
26. Tallmadge RL, McLaughlin K, Secor E, Ruano D, Matychak MB, Flaminio MJ. Expression of essential B cell genes and immunoglobulin isotypes suggests active development and gene recombination during equine gestation. *Dev Comp Immunol.* 2009;33:1027-38.
27. Bell SC, Savidge C, Taylor P, Knottenbelt DC, Carter SD. An immunodeficiency in Fell ponies: a preliminary study into cellular responses. *Equine Vet J.* 2001;33:687-92.
28. Thomas GW, Bell SC, Carter SD. Immunoglobulin and peripheral B-lymphocyte concentrations in Fell pony foal syndrome. *Equine Vet J.* 2005;37:48-52.
29. Thomas GW, Bell SC, Phythian C, Taylor P, Knottenbelt DC, Carter SD. Aid to the antemortem diagnosis of Fell pony foal syndrome by the analysis of B lymphocytes. *Vet Rec.* 2003;152:618-21.
30. Lunn D, Holmes M, Duffus W. Equine T-lymphocyte MHC II expression: variation with age and subset. *Vet Immunol Immunopathol.* 1993;35:225-38.

31. Fox-Clipsham LY, Brown EE, Carter SD, Swinburne JE. Population screening of endangered horse breeds for the foal immunodeficiency syndrome mutation. *Vet Rec.* 2011;169:655-8.
32. MacLeay JM, Ames TR, Hayden DW, Tumas DB. Acquired B lymphocyte deficiency and chronic enterocolitis in a 3-year-old quarter horse. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997;57:49-57.
33. Pellegrini-Masini A, Bentz AI, Johns IC, Parsons CS, Beech J, Flaminio MJ. Common variable immunodeficiency in three horses with presumptive bacterial meningitis. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;227:114-22.
34. Tennent-Brown BS, Navas de Solis C, Foreman JH, Goetz T, Fredrickson R, Borst L, et al. Common variable immunodeficiency in a horse with chronic peritonitis. *Equine Vet Educ.* 2010;22:393-9.
35. Freestone JF, Hietala S, Moulton J, Vivrette S. Acquired immunodeficiency in a seven-year-old horse. *J Am Vet Med Assoc.* 1987;190:689-91.
36. Flaminio MJ, LaCombe V, Kohn CW, Antczak DF. Common variable immunodeficiency in a horse. *J Am Vet Med Assoc.* 2002;22:1296-302.
37. Hagman J, Lukin K. Transcription factors drive B cell development. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:127-34.
38. Tallmadge RL, Such KA, Miller KC, Matychak MB, Felipe MJ. Expression of essential B cell developmental genes in horses with common variable immunodeficiency. *Mol Immunol.* 2012;51:169-76.
39. Flaminio MJ, Rush BR, Davis EG, Hennessy K, Shuman W, Wilkerson MJ. Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000;73:267-85.
40. Flaminio MJ, Rush BR, Cox JH, Moore WE. CD4+ and CD8+ T-lymphocytopenia in a filly with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Aust Vet J.* 1998;76:399-402.
41. McGuire TC, Poppie MJ. Hypogammaglobulinemia and thymic hypoplasia in horses: a primary combined immunodeficiency disorder. *Infect Immun.* 1973;8:272-7.
42. Perryman LE, Torbeck RL. Combined immunodeficiency of Arabian horses: confirmation of autosomal recessive mode of inheritance. *J Am Vet Med Assoc.* 1980;176:1250-1.
43. Perryman LE, Boreson CR, Conaway MW, Bartsch RC. Combined immunodeficiency in an Appaloosa foal. *Vet Pathol.* 1984;21:547-8.
44. Lew AM, Hosking CS, Studdert MJ. Immunologic aspects of combined immunodeficiency disease in Arabian foals. *Am J Vet Res.* 1980;41:1161-6.
45. Mair TS, Taylor FG, Harbour DA, Pearson GR. Concurrent cryptosporidium and coronavirus infections in an Arabian foal with combined immunodeficiency syndrome. *Vet Rec.* 1990;126:127-30.

46. Thompson DB, Spradbrow PB, Studdert M. Isolation of an adenovirus from an Arab foal with a combined immunodeficiency disease. *Aust Vet J.* 1976;52:435-7.
47. Wyatt CR, Magnuson NS, Perryman LE. Defective thymocyte maturation in horses with severe combined immunodeficiency. *J Immunol.* 1987;139:4072-6.
48. Perryman LE, McGuire TC. Mixed lymphocyte culture responses in combined immunodeficiency of horses. *Transplantation.* 1978;25:50-2.
49. Ardans AA, Trommershausen-Smith A, Osburn BI, Mayhew IG, Trees C, Park MI, et al. Immunotherapy in two foals with combined immunodeficiency, resulting in graft versus host reaction. *J Am Vet Med Assoc.* 1977;170:167-75.
50. Wiler R, Leber R, Moore BB, VanDyk LF, Perryman LE, Meek K. Equine severe combined immunodeficiency: a defect in V(D)J recombination and DNA-dependent protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:11485-9.
51. Shin EK, Perryman LE, Meek K. A kinase-negative mutation of DNA-PK(CS) in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. *J Immunol.* 1997;158:3565-9.
52. Perryman LE, McGuire TC, Crawford TB. Maintenance of foals with combined immunodeficiency: causes and control of secondary infections. *Am J Vet Res.* 1978;39:1043-7.
53. Bue CM, Davis WC, Magnuson NS, Mottironi VD, Ochs HD, Wyatt CR, et al. Correction of equine severe combined immunodeficiency by bone marrow transplantation. *Transplantation.* 1986;42:14-9.
54. Shin EK, Perryman LE, Meek K. Evaluation of a test for identification of Arabian horses heterozygous for the severe combined immunodeficiency trait. *J Am Vet Med Assoc.* 1997;211:1268-70.
55. Flaminio MJ, Rush BR, Davis EG, Shuman W, Wilkerson M. Simultaneous flow cytometric analysis of phagocytosis and oxidative burst activity of equine leukocytes. *Vet Res Commun.* 2002;26:85-92.
56. Gardner RB, Nydam DV, Luna JA, Bicalho ML, Matychak MB, Flaminio MJ. Serum opsonization capacity, phagocytosis, and oxidative burst activity in neonatal foals in the intensive care unit. *J Vet Intern Med.* 2007;21:797-805.
57. Gröndahl G, Sternberg S, Jensen-Waern M, Johannisson A. Opsonic capacity of foal serum for the two neonatal pathogens *Escherichia coli* and *Actinobacillus equuli*. *Equine Vet J.* 2001;33:670-5.
58. Gill AF, Gaunt S, Sirninger J. Congenital Pelger-Huët anomaly in a horse. *Vet Clin Pathol.* 2006;35:460-2.
59. Grondin TM, DeWitt SF, Keeton KS. Pelger-Huët anomaly in an Arabian horse. *Vet Clin Pathol.* 2007;36:306-10.

**Recebido em: 14/12/12**

**Aceito em: 14/02/13**



## RETROVIROSES DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS

Rômulo Cerqueira Leite<sup>1</sup>  
Jenner Karlisson Pimenta dos Reis<sup>1</sup>  
André Penido de Oliveira<sup>1</sup>  
Paula Maria Pires do Nascimento<sup>1</sup>  
Fernanda Gonçalves de Oliveira<sup>1</sup>  
João Helder Frederico de Faria Naves<sup>1</sup>  
Ana Paula de Souza Rodrigues<sup>1</sup>  
Marcela Ribeiro Gasparini<sup>1</sup>  
Fabiana Alves<sup>1</sup>  
Cairo Henrique Sousa de Oliveira<sup>1</sup>  
Daniela de Souza Rajão<sup>1</sup>  
Grazielle Cossenzo Florentino Galinari<sup>1</sup>

### RESUMO

A família *Retroviridae* possui este nome devido a enzima transcriptase reversa (do latim retro: caminho reverso) a qual transcreve o RNA genômico viral em DNA que migra para o núcleo da célula integrando-se ao genoma do hospedeiro. A partir da infecção por um retrovirus os hospedeiros se tornam persistentemente infectados e passam a desenvolver os mais variados sinais clínicos e doenças caracterizadas pelo surgimento de tumores, imunodepressão e doenças inflamatórias localizadas ou sistêmicas. Membros da família *Retroviridae* estão classificados em vários gêneros e espécies como os lentivirus de pequenos ruminantes que afetam caprinos e ovinos, vírus da anemia infecciosa eqüina dos equinos, vírus da imunodeficiência felina dos felídeos que normalmente estão associados a doenças de progressão lenta, crônica e degenerativa. Alguns retrovirus podem ainda induzir o surgimento de tumores como o vírus da leucemia felina ou da leucose enzoótica bovina. Como as retroviroses tem grande impacto na veterinária, levando a perdas econômicas expressivas devido a diminuição da produção animal e barreiras à importação de animais vivos e produtos de origem animal, estratégias de controle se tornam prioritárias em rebanhos infectados ou rebanhos livres com risco de infecção.

**Palavras-chave:** retrovírus, animais domésticos, epidemiologia e clínica.

## RETROVIRUS DE ANIMALES DOMÉSTICOS

### RESUMEN

La familia *Retroviridae* tiene este nombre debido a que la enzima transcriptasa inversa (del latín retro: camino inverso), que transcribe el ARN genómico viral en el ADN que migra al núcleo de la célula se integrando al genoma huésped. Después de la infección con los retrovirus, los huéspedes quedan infectados de forma persistente y comienzan a desarrollar diversos signos clínicos y patológicos caracterizados por la aparición de tumores, inmunodepresión e inflamaciones localizadas o sistémicas. Los miembros de la familia *Retroviridae* se clasifican en varios géneros y especies como el Lentivirus de pequeños rumiantes que afecta a las ovejas y a las cabras, virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia felina, que normalmente están asociados con enfermedades de

<sup>1</sup> Laboratório de Retroviroses - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627-Caixa Postal 567, campus Pampulha da UFMG, Belo Horizonte, MG-CEP 30123-970. jenner@ufmg.br

progresión lenta, degenerativa y crónica. Algunos retrovirus también pueden inducir la aparición de tumores tales como el virus de la leucemia felina o de la leucosis bovina enzoótica. Debido a que los retrovirus tienen gran impacto en la veterinaria, dando lugar a importantes pérdidas económicas debido a la disminución de la productividad animal y a las barreras a las importaciones de animales vivos y a los productos de origen animal, las estrategias de control se convirtieron en una prioridad en rebaños infectados o en rebaños libres con riesgo de infección.

**Keywords:** retroviruses, domestic animal, epidemiologic, clinic.

## RETROVIRUSES OF DOMESTIC ANIMALS

### ABSTRACT

Se denomina familia Retroviridae al conjunto de virus que posee la enzima transcriptasa inversa (del latín retro: camino inverso), que transcribe el ARN genómico viral en el ADN que migra al núcleo de la célula integrándose al genoma del huésped. Una vez colonizados por retrovirus, los huéspedes sufren infección persistente y desarrollan diversos signos clínicos y patológicos caracterizados por la aparición de tumores, inmunodepresión e inflamaciones localizadas o sistémicas. Los miembros de la familia Retroviridae se clasifican en varios géneros y especies como el Lentivirus de pequeños rumiantes que afecta a las ovejas y a las cabras, el virus de la anemia infecciosa equina y el virus de la inmunodeficiencia felina, que normalmente están asociados con enfermedades de curso lento, degenerativas y crónicas. Algunos retrovirus también pueden llevar a la aparición de tumores tales como el virus de la leucemia felina o de la leucosis bovina enzoótica. Debido a que los retrovirus tienen gran impacto en la veterinaria, dando lugar a importantes pérdidas económicas debido a (1) la disminución de la productividad animal y (2) a las barreras a las importaciones de animales vivos y a los productos de origen animal, las estrategias de control se convirtieron en una prioridad en rebaños infectados o en rebaños libres con riesgo de infección.

**Palabras clave:** retrovirus, animals domesticos, epidemiologia, clínica.

### INTRODUÇÃO

Os retrovirus são conhecidos de longa data pelo seu potencial em causar doenças de progressão lenta, debilitantes, degenerativas e em algumas situações fatais pelo surgimento de quadros agudos imunossupressivos com ou sem a presença de tumores. As perdas econômicas relacionadas às retrovirose são diretas pelo comprometimento da produção animal ou indiretas por barreiras a comercialização de animais vivos ou produtos de origem animal. O diagnóstico das retrovirose normalmente é dependente de testes laboratoriais uma vez que os sinais clínicos são variados, existem associações com agentes oportunistas e podem confundir com outras patologias. Além do diagnóstico preciso, seu controle é dependente de boas práticas de manejo e assistência veterinária. Como os animais acometidos por retrovirus normalmente se tornam permanentemente infectados o grande desafio hoje é o desenvolvimento de testes diagnósticos sensíveis e específicos e vacinas capazes de prevenir a infecção ou o desenvolvimento de doenças em animais que possuem os provirus integrados em seu genoma.

## Artrite Encefalite Caprina

O vírus da artrite-encefalite caprina é um retrovírus não oncogênico, caracterizado por causar infecção persistente, provocando enfermidades de curso progressivo e debilitante (1). Estudos recentes tem demonstrado que o vírus da artrite-encefalite caprina e o Maedi-visna dos ovinos fazem parte de um mesmo grupo heterogêneo e não são mais considerados espécie específicos sendo denominados de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR).

O vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, sendo um vírus envelopado de simetria icosaédrica com tamanho entre 80 e 100 nm, genoma do tipo RNA linear com duas fitas simples não complementares de sentido positivo (2).

O CAEV apresenta no seu envelope uma glicoproteína, a gp135, e no capsídeo, a p28, que induzem a formação de anticorpos nos animais infectados. Possui também a transcriptase reversa, que é uma DNA polimerase RNA dependente, essencial para a transcrição do RNA viral em DNA proviral e a integrase, responsável pela integração deste último ao genoma da célula hospedeira (3).

No Brasil, a ocorrência de soropositividade para CAE (artrite-encefalite caprina) foi relatada pela primeira vez no Rio Grande do Sul (4). Estudos soroepidemiológicos têm demonstrado a ocorrência dos LVPR em vários estados brasileiros, principalmente no rebanho caprino (1). A falta de controle sanitário na introdução de animais tem sido o principal fator a contribuir para a presença desses patógenos (5).

A CAE é uma enfermidade infecciosa, multissistêmica que infecta caprinos em várias fases do desenvolvimento etário, independente de sexo, raça e produção (6). Este vírus causa infecção persistente com período de incubação longo, determinando importantes perdas econômicas (7).

Na maioria das vezes, os animais desenvolvem uma resposta humoral com títulos de anticorpos detectáveis por testes sorológicos, mas que não resultam na eliminação do vírus do organismo. Uma vez infectado, o animal permanece como portador e fonte de infecção para o rebanho durante toda a sua vida (8). O CAEV possui tropismo pelas células do sistema mononuclear fagocitário (monócitos e macrófagos), estimulando a produção de anticorpos contra as proteínas da cápside e das glicoproteínas do envelope do vírus (7).

Após a penetração, a partir do RNA viral, a transcriptase reversa gera DNA de dupla fita, que se integra ao DNA cromossômico da célula hospedeira. A replicação fica restrita nesta primeira etapa, sem produção de proteínas e partículas virais. Dessa forma, a infecção persiste, com mínima ativação da resposta imune (2).

A expressão e liberação do vírus ocorrem à medida que os monócitos infectados se diferenciam em macrófagos. A doença resulta da inflamação decorrente da reação do sistema imune do hospedeiro contra o vírus. Os animais infectados com CAEV não podem ser considerados imunossuprimidos, mas não se pode excluir a possibilidade que as células imunes estão funcionalmente afetadas (9).

A infecção ocorre principalmente durante os primeiros meses de vida, pela ingestão de leite ou colostro de cabras infectadas pelo CAEV (7). A introdução de fêmeas infectadas nos rebanhos acelera a disseminação do vírus no mesmo, provavelmente em virtude de fatores, tais como contato prolongado e problemas na ordenhadeira mecânica provocando lesões no teto (10). Há evidências que indicam a transmissão materna fetal do CAEV, mesmo que com baixa incidência, podendo ocorrer por duas possíveis vias: transmissão intrauterina e transmissão no canal vaginal no momento do parto, pela ingestão ou inalação de células infectadas pelas crias (11). O vírus também já foi identificado no sêmen de animais infectados, representando assim uma possibilidade de transmissão pela monta natural ou inseminação artificial (12).

As alterações clínicas mais comumente identificadas em caprinos são a articular, mamária, neurológica e pulmonar. A forma articular é a mais comum, acometendo animais a partir de 6 meses e é caracterizada principalmente pelo aumento de volume da articulação do carpo, atingindo um ou dois membros anteriores. Exames anatomopatológicos e radiológicos demonstram a presença de periartrite com espessamento capsular, associada a deposições de minerais e edema de tecido conjuntivo, podendo levar a claudicação e posições anômalas, devido à dor causada pelo edema (6).

A glândula mamária pode apresentar lesões e em casos crônicos são determinadas por uma mamite intersticial com endurecimento do úbere e posterior diminuição da produção láctea, de forma gradativa, atingindo o grau máximo da agalaxia (13). A forma neurológica é mais comum em cabritos de um a quatro meses, sendo responsável por paresia ou ataxia dos membros posteriores, andar em círculo, cegueira, opstótomo, incoordenação e tremores musculares (7). Outros sinais clínicos descritos são os respiratórios, presentes com menos frequência em caprinos e muito conhecida em ovinos como “pneumonia progressiva ovina”. Os sintomas mais significativos são: aumento da frequência respiratória, intolerância a esforço físico, dispneia e tosse seca (5, 14).

A IDGA (imunodifusão em ágar gel) é o teste recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para diagnóstico da CAE, o qual além de prático tem baixo custo e boa especificidade (15). Entretanto, os animais infectados por esses vírus podem apresentar soroconversão tardia e variação nos níveis de anticorpos durante a vida, o que reduz a sensibilidade e tem implicação direta no sucesso de programas de controle (16). As técnicas de ELISA e reação em cadeia polimerase (PCR) são mais sensíveis para a detecção de animais infectados pelo vírus da CAE, mas em contrapartida são mais onerosas, de difícil execução e muitas vezes disponíveis apenas para pesquisas.

A possibilidade do isolamento e identificação do agente existe, mas não é rotineiramente empregado por ser demorado e bastante dispendioso (17), no entanto a utilização de fragmentos de explantes de membrana sinovial caprina nos isolamentos representa a possibilidade de identificação precoce de amostras virais, mesmo antes do surgimento de efeito citopático perceptível e da formação de monocamadas (18).

A prevenção e controle da doença baseiam-se na diminuição dos riscos de infecção pelo vírus (5). No Brasil a CAE está distribuída na grande maioria dos criatórios do país, muitas vezes com uma prevalência de 80%, tornando-se um importante problema para a caprinocultura brasileira. Desta forma novas medidas devem ser tomadas para se controlar a disseminação da doença, uma vez que o abate dos animais soropositivos, torna-se impraticável e muito oneroso ao produtor. Uma opção é a identificação por diagnóstico sorológico ou mesmo molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e separação dos animais positivos dos negativos, caracterizando dentro da propriedade dois sistemas individuais: um soropositivo e outro soronegativo.

Nos plantéis suspeitos ou sabidamente positivos, algumas recomendações são essenciais para se iniciar um programa de controle, como realizar teste sorológico dos animais com intervalos regulares; separar as crias imediatamente após o nascimento, evitar o contato com secreções e isolá-las dos adultos; alimentação artificial com colostro e leite tratados termicamente ou sucedâneos do leite; adotar linha de ordenha; e usar materiais esterilizados, como seringas e agulhas, instrumentos cirúrgicos, tatuador entre outros (19).

A quarentena, diagnóstico sorológico e espera do resultado deste diagnóstico também são indicados no caso de aquisição de novos animais. Somente animais soronegativos devem ser adquiridos.

## Anemia Infecciosa Equina

A Anemia Infecciosa Equina (AIE), também conhecida como febre dos pântanos, é uma doença incurável que acomete membros da família dos Equídeos. Foi a primeira doença animal descrita causada por vírus, ainda no início do século passado. A AIE permanece como obstáculo ao desenvolvimento da equideocultura, é uma doença endêmica, transmitida principalmente por tabanídeos e fômites contaminados com sangue infectado.

A AIE é causada pelo vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), um lentivirus pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*. Seu genoma é composto por duas fitas simples de RNA não complementares de aproximadamente 8,2 kb, o menor entre os lentivirus (20). O EIAV contém três principais genes estruturais e funcionais: o gene *gag* codifica as proteínas p26, p15, p11 e p9, presentes no capsídio viral; o gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease e o gene *env* codifica as glicoproteínas transmembrana, gp45, e de superfície, gp90 (20, 21).

A AIE apresenta distribuição mundial, com maior ocorrência nas áreas tropicais ou subtropicais pantanosas e que apresentam populações numerosas de artrópodes vetores (20-22). Em áreas endêmicas, a prevalência pode atingir 70% dos animais adultos. Estudos sorológicos em vários estados brasileiros, como o Pará, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, demonstraram a presença do EIAV na população equina do país (23, 24).

Os dados oficiais da AIE no mundo não apresentam a verdadeira prevalência da doença, pois são considerados apenas os exames laboratoriais realizados para trânsito intermunicipal ou interestadual realizados para venda de animais ou para participação em eventos agropecuários. Estima-se que menos de 10% da população dos equídeos tenha sido testada para AIE, sendo que a maior parte dos animais pertence a rebanhos de alto valor zootécnico nos quais a doença está controlada. Os animais no campo que não são submetidos ao diagnóstico representam um risco para a manutenção e disseminação da doença (25).

O sangue de cavalos persistentemente infectados é a fonte mais importante de transmissão do EIAV, que pode ser transferido por insetos hematófagos da ordem *Diptera*, principalmente os tabanídeos. Outra potencial forma de transmissão é por meio de utensílios contaminados com sangue (agulhas, materiais cirúrgicos, freios, esporas) principalmente em práticas veterinárias e durante o manejo inadequado dos animais. Os animais podem desenvolver sinais clínicos da doença em torno de 15 a 60 dias após a exposição ao vírus, antes mesmo do animal ser diagnosticado como positivo. (21, 26). A replicação contínua do vírus *in vivo* tem como alvo primário as células das linhagens monócito/macrófago, podendo também haver uma limitada infecção em células endoteliais macrovasculares nos tecidos renais de equídeos portadores inaparentes. Embora ocorra uma redução de até 700 vezes nos títulos virais no sangue de animais assintomáticos quando comparados com animais virêmicos, estima-se que a replicação viral continue nesses períodos, nos macrófagos de diferentes órgãos, como o fígado, linfonodos e baço (23, 25).

Os sinais clínicos da AIE são variáveis e irão depender da dose e da virulência da amostra infectante, como também da susceptibilidade individual do hospedeiro. Apesar disso, a resposta clínica dos equídeos acometidos com AIE pode ser dividida em três fases: aguda, crônica e inaparente (27). As principais manifestações clínicas da fase aguda são a trombocitopenia associada à febre e anorexia, e esses sinais clínicos iniciais da doença desaparecem dentro de poucos dias, contudo uma pequena porcentagem de animais pode desenvolver forma grave e fatal da AIE (25).

A fase crônica é caracterizada por ciclos recorrentes de viremia associada a sinais clínicos como febre, anorexia, edema, leucopenia, anemia, trombocitopenia, hemorragias, diarréia, glomerulonefrite e letargia, e tem duração de três a cinco dias, e o intervalo entre os ciclos da doença é irregular, podendo ser de semanas a meses. A maioria dos equídeos

infectados que sobrevivem à fase aguda e crônica se tornam portadores inaparentes do EIAV por toda vida (25).

A detecção de anticorpos contra o EIAV é o método laboratorial mais empregado para o diagnóstico da AIE. No Brasil, e em vários países do mundo, o método oficial de diagnóstico de AIE é a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) ou teste de Coggins, considerado como prova padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), bem como pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (24). Apesar de ser usada em larga escala, a IDGA apresenta algumas limitações, dentre elas a incapacidade de detectar anticorpos específicos nos estágios iniciais da infecção (28).

Testes de ELISA para AIE têm sido desenvolvidos e aprovados em alguns países, apresentando boa correlação com a IDGA e melhor sensibilidade em muitos casos, principalmente na detecção de animais positivos em uma fase mais inicial da infecção (25, 27). O imunoblot para AIE tem sido uma importante ferramenta de pesquisa para explicar casos em que há discordância entre os resultados da IDGA e ELISA (29). Testes moleculares para a detecção do genoma do EIAV foram recentemente desenvolvidos, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real, no entanto, ainda possuem o uso restrito aos laboratórios de pesquisa (30).

A AIE é uma doença que não possui tratamento nem vacina eficaz, portanto, seu controle ocorre basicamente pela identificação, segregação e eutanásia dos animais soropositivos para o EIAV (24). No Brasil, as medidas de controle e profilaxia à AIE seguem o Programa Nacional de Sanidade de Equídeos (PNSE), sendo que, atualmente está em vigor a Instrução Normativa nº 45 de 15 de junho de 2004, que contém normas para prevenção e o controle da AIE. A notificação da doença é obrigatória no território brasileiro (31). Animais destinados ao comércio, trânsito, participação em competições, feiras e exposições devem ser necessariamente testados e, apresentar resultado negativo no teste de IDGA.

As principais medidas de controle são: isolamento dos animais positivos até a eutanásia; não compartilhar seringas e outros utensílios que possam ser veículo do vírus; combater insetos vetores em áreas endêmicas (inviável em grandes áreas ou em áreas de grande infestação, mas viável em instalações), como também minimizar o contato de equinos com outros equinos de status sanitário desconhecido, até que sejam testados e certificados livres do vírus (20, 24).

## Imunodeficiência Bovina

A imunodeficiência viral bovina é uma doença crônica e progressiva que acomete bovinos. O agente etiológico da imunodeficiência bovina (BIV) é um *lentivírus* que possui ampla distribuição geográfica, com longo período de incubação e geralmente apresentação subclínica. O BIV induz sinais de leucocitose persistente, linfadenopatia, emagrecimento e lesões do sistema nervoso central. O vírus também está associado com a diminuição da produção de leite e da resposta linfocitária. Além disso, há evidência de que ele pode causar imunossupressão, podendo desencadear infecções bacterianas secundárias, diminuição da resposta imunológica a vacinas e encefalite. Embora tenha sido caracterizado molecularmente, pouco se sabe sobre a biologia da infecção natural do BIV, sendo necessários mais estudos para esclarecer a patogênese do vírus.

O vírus da imunodeficiência bovina (BIV), também conhecido como Lentivírus Bovino é membro da família *Retroviridae*, se assemelha genética, bioquímica, antigênica e estruturalmente ao vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e por ser muito semelhante, tem sido usado como modelo biológico potencialmente útil para a compreensão da patogênese do HIV-1 em métodos de avaliação da eficácia dos tratamentos, teste de drogas e controle da infecção viral (32).

O BIV foi isolado originalmente em 1972 por Van Der Maaten na Louisiana nos Estados Unidos, de uma vaca apresentava linfocitose persistente, linfadenopatia, emagrecimento progressivo e lesões no sistema nervoso central (33). Evidências sorológicas sugerem que o BIV esteja distribuído mundialmente e estudos soroepidemiológicos mostram registros variando de 1,4% a 80% de prevalência de infecções (33) onde desde sua primeira descrição em 1972, esta prevalência tem sido relatada em bovino leiteiro e de corte no Canadá, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Venezuela, França, Alemanha, Itália, Suíça, Holanda, Reino Unido, Costa Rica, Turquia, Nova Zelândia, Austrália, Japão, Coreia, Índia, Irã e há relatos de infecção em búfalos no Paquistão, e em animais de tração na Camboja e na Indonésia.

O BIV é transmitido verticalmente no útero por via transplacentária, e pelo colostro ou horizontalmente pela troca de fluídos corporais e pelo sangue. O DNA proviral do BIV já foi detectado *in vivo* em uma grande variedade de tecidos de bovinos, incluindo o cérebro, os pulmões, nódulos linfáticos, baço, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e sêmen (34).

A transmissão experimental do BIV pode ocorrer pela administração de sangue total de um animal infectado por via intravenosa (35). O uso de agulhas e materiais cirúrgicos contaminados, ingestão de colostro de fêmeas infectadas e a higienização deficiente de instrumentos utilizados em práticas invasivas, como castrações e descornas, também podem ser fatores responsáveis pela transmissão do BIV.

Sob condições naturais, os lentivírus são altamente espécie-específicos, e o BIV infecta naturalmente bovinos, mas pode infectar experimentalmente ovinos, caprinos e coelhos(36). O vírus replica em células *in vitro* induzindo um efeito citopático caracterizado pela formação de sincícios (34). *In vivo*, infecta monócitos/macrófagos com uma possível disfunção no sistema imune.

A imunodeficiência bovina induz poucos sinais clínicos, e em animais experimentalmente infectados, a doença tem uma progressão semelhante àquela observada nos casos de HIV. Como consequência os animais apresentam uma infecção crônica e persistente pelo resto da vida. Há poucos estudos demonstrando que o BIV seja capaz de, isoladamente, produzir manifestações clínicas patológicas específicas, e em muitos casos, a infecção pode estar associada à outra enfermidade viral, como a Leucose Enzoótica Bovina, aumentando assim a probabilidade do aparecimento de sinais clínicos (37).

Em bovinos experimentalmente infectados, os animais podem apresentar linfocitose, hiperplasia linfóide, linfossarcoma e infecções bacterianas secundárias (38) devido à imunossupressão. Estudos experimentais têm demonstrado a presença de encefalite sem evidência de sinais clínicos (39). Já em achados de necropsias, algumas alterações clínicas foram percebidas, incluindo infiltrados linfocitários perivasculares cerebrais leves (40).

Alguns sinais ainda podem ser percebidos tais como claudicação ou andar rígido, que podem acometer um ou mais membros. Notam-se ainda sintomas nervosos, como alterações de comportamento, irritação e agressão, apresentados por alguns animais. Em outros casos, é possível constatar depressão, letargia, ataxia, e, às vezes, decúbito.

Vacas leiteiras canadenses infectadas com BIV apresentaram um decréscimo na produção média de leite (41), e a ocorrência do vírus também pode ser associada a infecções bacterianas secundárias, complicações no parto e início da lactação. Estudos ainda sugerem que haja uma relação entre fatores de estresse e a infecção viral pelo BIV, e que sob condições experimentais, os animais não manifestam totalmente a doença, desde que seja aplicado um manejo de forma correta, eliminando ou evitando o estresse do animal (39). Porém, a susceptibilidade à infecção pelo BIV pode depender da cepa do vírus, raças bovinas e de fatores ambientais (38-42).

O diagnóstico da infecção pelo BIV pode ser realizado pela detecção de anticorpos, com o uso de técnicas de Imunofluorescência Indireta (IFA), *Western Blott*, Ensaio Imuno-

enzimático (ELISA) e Reação da Cadeia em Polimerase (PCR). Anticorpos para o BIV podem ser detectados três semanas após a infecção, e podem persistir por mais de dois anos em animais experimentalmente inoculados (43). A detecção do provírus e do RNA genômico, em células infectadas, pode ser realizada pelo uso de técnicas de PCR e transcriptase reversa de PCR (RT-PCR) respectivamente. O isolamento viral é uma técnica pouco utilizada devido à baixa sensibilidade e especificidade.

As principais medidas de controle da infecção pelo BIV consistem na identificação precoce da doença no rebanho e segregação dos animais acometidos uma vez que não existem vacinas comerciais no Brasil. A presença da infecção viral no Brasil pode ser considerada como um fator de risco para a saúde do rebanho, e um potencial agente causador de doença crônica em bovinos, podendo levar a uma perda econômica significativa para o produtor por causas diretas e indiretas.

### Imunodeficiência felina

Animais infectados com os vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) podem ter suas barreiras imunológicas comprometidas e desencadearem a imunodeficiência felina ao longo da infecção, abrindo portas para doenças oportunistas e sendo fontes de zoonoses (44-48). Estes Retrovírus têm distribuição mundial e assim como os outros membros desta família causam infecção persistente e provocam doenças crônicas como: tumores e imunossupressão em animais domésticos e selvagens (46-49). A incidência destes vírus está diretamente relacionada com a densidade populacional.

O *Lentivirus* FIV e *Gamaretrovirus* FeLV tem tido relevante destaque nos últimos anos, devido à sua similaridade com o HIV-1 e aos estudos da carcinogênese em humanos, respectivamente (50, 51). O diagnóstico de FIV e FeLV deve constar de uma associação entre os sinais clínicos e o diagnóstico laboratorial, pois os sinais clínicos podem ser confundidos com os de outras doenças (44, 45, 47, 50, 51). As principais formas de prevenção são: castração, evitar animais vadios, isolar e tratar animais positivos (44, 45, 47, 50-52). No Brasil ainda não há uma vacina para FIV, e para FeLV existem vacinas disponíveis comercialmente que reduzem até 70% a incidência da doença (45, 52).

O FIV foi isolado pela primeira vez em 1986, em Petaluma na Califórnia, EUA (53). É um *Lentivirus* pertencente à família Retroviridae classificado em cinco subtipos (A, B, C, D e E) com base na variação nucleotídica da região V3 e V5 do gene *env* (54). O virion é esférico, envelopado, tem 100-125 nm de diâmetro (53). O ácido nucléico é dimérico, consistindo de duas moléculas de RNA fita simples com cerca de 9.474 nucleotídeos (53, 54).

Assim como os outros retrovírus sua estrutura genômica é constituída de três grandes quadros de leitura abertos (ORFs): *gag*, *pol* e *env*, que codifica a proteína do capsídeo p24; integrase, protease e transcriptase reversa; a glicoproteína viral (gp120) e a proteína transmembrana (gp41), respectivamente. Sendo os genes *gag* e *pol* relativamente conservados entre os subtipos (55, 56).

A prevalência e incidência são variáveis entre as localizações geográficas e está relacionada ao estilo, idade, estado de saúde e gênero do animal (44, 46, 48, 57). Há estimativas de uma soroprevalência de 1-14% em gatos com sinais clínicos e até 44% em animais doentes (44, 47, 58). O FIV pode ser transmitido pela saliva, principalmente por mordidas infringidas durante brigas. Gatos machos com livre acesso às ruas e adultos doentes são mais suscetíveis à infecção, pois são territorialistas e possuem uma menor imunidade (44, 46, 47, 56, 57). A transmissão também pode ocorrer por via transplacentária, pelo colostro, leite, ou pelo sêmen de animais soropositivos, pela exposição da mucosa, transferência de sangue e durante o acasalamento. Em infecções naturais, a eficácia da imunidade colostrar não é conhecida (44, 46, 47, 59).



O FIV tem um tropismo por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, macrófagos, células dendríticas e células do sistema nervoso central, sendo que o maior alvo são os linfócitos CD4<sup>+</sup> (44, 47, 51). Como receptor primário de ligação, o FIV usa o receptor CD134 (OX40) em conjugação com o receptor de quimicina CXCR4 como co-fator para a infecção (60).

A infecção causa uma alta viremia, que decai após algumas semanas, com o desenvolvimento de uma imunidade parcial. Células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) específicas para o FIV se desenvolvem logo após início da infecção e persistem ao longo do estágio assintomático da doença. Entretanto, a resposta imune normalmente não elimina o vírus e a fase aguda é seguida de uma etapa assintomática, que geralmente persiste por anos. A maioria dos animais infectados morre em função dos efeitos virais ou pelas infecções secundárias resultantes da imunossupressão (44, 46-48, 52, 53, 61).

Animais positivos podem apresentar alterações patológicas como: alterações na morfologia de linfonodo, timo, trato intestinal, fígado, rim, sistema nervoso central, músculo esquelético e falhas reprodutivas (44, 46, 47, 61).

Clinicamente, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida dos Felinos (FAIDS) pode ser caracterizada por quatro fases: a aguda, que pode durar de meses a anos, em que o animal infectado pode apresentar neutropenia, febre, letargia, linfadenopatia periférica, perda de peso; a assintomática, que pode durar anos, na qual o animal não apresenta sinais clínicos, mas pode apresentar um progressivo declínio do número de células CD4<sup>+</sup>; a ARC (AIDS related complex) pode levar meses para o gato infectado apresentar sintomas como: linfadenopatia generalizada, febre recorrente, apatia, leucopenia, anemia, anorexia, depressão, rinite crônica, glomerulonefrite, perda de peso, gengivite e estomatite crônica e alterações comportamentais; a FAIDS, que leva meses e o animal apresenta os sintomas apresentados na ARC mais imunodeficiência, infecções oportunistas, neoplasias e anormalidades neurológicas (44, 46, 47, 52, 60, 61).

O diagnóstico clínico deve ser associado ao laboratorial. Os métodos mais utilizados atualmente para a detecção da infecção por FIV em gatos domésticos são: isolamento viral, ensaios sorológicos indiretos e ensaios moleculares. Sendo o isolamento viral o método mais eficaz, no entanto, é um método muito laborioso, impraticável na rotina (44, 46, 48).

Testes como ELISA e testes imunocromatográficos oferecem vantagens como velocidade e conveniência (44, 47, 48). Estes testes detectam anticorpos que reconhecem proteínas virais estruturais. No entanto, quando os resultados são inconclusivos por estes ensaios, o teste mais específico para comprovação é o *Western Blot* (45, 48). A PCR pode ter resultados duvidosos, devido à grande variabilidade genética do FIV (53). A especificidade e sensibilidade do PCR pode variar de 40-100% de acordo com a metodologia e padronização de laboratório (44, 45, 48). Existem também técnicas para a visualização da proporção de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> no entanto, devido à complexidade destes testes não são usados rotineiramente.

Após a identificação dos animais positivos, o controle pode ser realizado pelo isolamento e tratamento ou quando necessário a eutanásia dos animais infectados, reduzindo-se assim a possibilidade de transmissão. A castração e limitação de gatos domésticos às ruas, também é uma forma de controle que pode reduzir o risco de contaminação (44, 51, 52). A vacinação é um assunto que gera controvérsias (44, 48). Diversas vacinas experimentais inativadas, recombinantes e de DNA tem sido desenvolvidas (52). No entanto, a diversidade genética e antigênica dos isolados de campo tem dificultado seu sucesso e a sua utilização (52, 53, 62).

Ainda não existem vacinas comercializadas no Brasil (51). Em 2002, uma vacina contra o FIV subtipos A e D e que também confere imunidade para o subtipo B (FIV-FC1) foi licenciada nos Estados Unidos. Esta vacina promove a formação de anticorpos indistinguíveis dos produzidos durante infecção natural e os métodos sorológicos não são capazes de promover a distinção entre animais vacinados e naturalmente infectados (44, 52).

O diagnóstico precoce é importante para o início do tratamento. O animal em tratamento deve ser submetido rotineiramente à exames hematológicos para análise de seu estado de saúde (44, 48, 53). Alguns estudos demonstram resultados promissores com a utilização de interferon recombinante para o tratamento da infecção pelo FIV, aumentando a sobrevivência dos animais infectados. Drogas imunoestimuladoras, o azidotimidina (AZT) e a lamivudina, também são utilizadas, apresentando bons resultados ao estado imunológico e clínico dos animais infectados (44, 46, 52). Animais infectados requerem atenção para as infecções secundárias, devendo ser utilizados antibióticos, anti-inflamatórios, fluidoterapia e suporte nutricional quando necessário (44, 46, 51, 52).

### Leucemia felina

O Vírus da leucemia felina (FeLV) foi descrito em 1964 por William Jarrett e colaboradores ao encontrarem partículas virais ligadas à membrana de linfoblastos em um gato com linfoma (63). É um *Gamaretrovirus* pertencente à família Retroviridae classificado em quatro subgrupos FeLV-A, o FeLV-B, FeLV-C e FeLV-T) identificados geneticamente de acordo com diferenças no gene da SU e, funcionalmente, pela utilização de diferentes receptores para entrada na célula hospedeira (64).

Este vírus possui envelope lipoprotéico e RNA fita simples como material genético. E assim como o FIV, seu genoma é composto pelos genes *env*, *pol* e *gag* que codificam proteínas estruturais internas (p15c, p12, p27 e p10); proteínas envolvidas na replicação viral (integrase, RT) e proteínas do envelope viral (gp70 e p15e), respectivamente (65, 66).

O FeLV tem distribuição mundial, infecta principalmente gatos domésticos, mas existem relatos em felinos selvagens. Sua prevalência varia de acordo com o gênero, a distribuição geográfica, o acesso à rua, o estado de saúde do animal e a densidade elevada de gatos (44, 52, 57, 65-67). O contato permanente com gatos de rua, abrigos e residências com muitos gatos FeLV facilita a disseminação do vírus. O grupo de risco compreende principalmente machos, devido à sua característica errante, animais de um a cinco anos de idade (65, 67). Gatos mais velhos são mais resistentes a infecção por FeLV, mas pode ser infectado por altas doses virais (66).

A principal forma de transmissão é pela via oronasal, a partir da saliva e secreções nasais contendo grande quantidade do vírus, para infecção é necessário um contato prolongado, como por exemplo, recipientes de alimentos e água (61). A transmissão vertical também pode ocorrer, assim como, também a partir da urina, fezes, leite, lágrimas e ato sexual (44, 65, 66). Devido aos avanços no diagnóstico de doenças e de vacinação, a prevalência de FeLV caiu substancialmente nas últimas duas décadas (66).

Após a infecção oronasal, FeLV está presente no sangue em duas diferentes fases de infecção: viremia primária, em que o vírus se replica em linfócitos e monócitos nas tonsilas e nos linfonodos regionais, fase chamada de infecção aguda. Durante a fase inicial alguns gatos são capazes de montar uma eficaz resposta imunitária e eliminam o vírus da circulação. A segunda fase o vírus infecta linfócitos e monócitos circulantes e atinge órgãos linfoides, esta fase se caracteriza por uma infecção persistente da medula óssea e outros tecidos (44, 61, 63, 65).

No entanto, após a infecção a relação do vírus com o animal pode se enquadrar em quatro possibilidades de acordo com o estado de saúde do animal: regressão da infecção – ação de anticorpos neutralizantes ou infecção latente sem replicação viral; infecção progressiva – não há neutralização do vírus pelo sistema imunológico do animal, ocorre replicação viral, resultando em viremia e progressão da doença; viremia transitória ou regressiva – a viremia é eliminada após o estabelecimento da imunidade protetora do animal (máximo 16 semanas); infecção atípica – a infecção viral é local e não ocorre viremia (44, 52, 63, 65, 68).

A patogênese de FeLV é diferente em cada gato e depende do estado imunitário, idade do animal, o subgrupo do vírus, condições ambientais e doenças concomitantes, e pode resultar em morte rápida, breve viremia sintomatológica, e em muitos casos o aparecimento de manifestações clínicas podem levar meses ou anos (44, 50, 52, 65-67). Os estágios de replicação do FeLV podem ser correlacionados à seis estágios: [1] infecção de linfócitos e medula óssea; [2 e 3] alterações no sistema imune; [4] anemia e linfoma; [5] mielossupressão e leucemia; e [6] trombocitopenia e neutropenia (44).

A relação do FeLV à tumores como linfoma e leucemia, explica-se pela sua capacidade de inserção ao genoma da célula hospedeira, próximo a um oncogene, o que resulta na proliferação celular. A célula transformada passa a apresentar o antígeno de membrana *felineoncovirusassociated-membraneantigens* (FOCMA), que são atacadas pela ação citotóxica mediada por células (ADCC), o que pode estar associado à imunodeficiência (52).

Os sinais clínicos associados ao FeLV são variáveis e pode incluir tumores, principalmente linfoma e leucemia; atrofia do timo; anemia, alterações hematológicas como neutropenia, linfopenia, síndromes de supressão medular, imunossupressão, neuropatias, doenças auto-imune como glomerulonefrite e poliartrite; falhas reprodutivas; entre outros. Os sintomas podem ser decorrentes da infecção pelo FeLV ou de doenças oportunistas ocasionadas por protozoários, bactérias, fungos e outros vírus (52, 61, 63, 65, 66). A infecção pelo FeLV potencializa a infecção pelo FIV, agravando os sinais clínicos e patogenia da doença (61).

O diagnóstico precoce é de extrema importância para a prevenção e controle de FeLV e deve ser embasado nos sinais clínicos, estilo de vida do animal e exames laboratoriais sorológicos e moleculares. Animais doentes, que serão introduzidos em um novo ambiente ou que apresentem risco de infecção devem ser testados. Os exames laboratoriais sorológicos detectam principalmente a proteína p27 nos leucócitos, plasma, soro, saliva ou lágrima dos animais infectados (44, 65, 69, 70).

Os principais testes utilizados para o diagnóstico de FeLV são imunofluorescência direta, ELISA, testes de imunocromatografia e isolamento viral (menos utilizado por ser muito laborioso) (69). Testes moleculares como a PCR detectam o DNA proviral, mas não pode ser utilizada para detectar a viremia, no entanto, a técnica de RT-PCR, informa a progressão da viremia. Como em outros retrovírus, podem ocorrer mutações e gerar um resultado falso negativo na PCR (44, 70).

Os resultados obtidos na sorologia devem ser associados ao estilo de vida, idade e estado de saúde do animal. Animais com menos de 12 semanas negativos que tiveram contato com animais infectados devem ser retestados após 4 a 6 semanas; e animais positivos são considerados infectados. Animais com mais de 12 semanas positivos e doentes são considerados infectados; e os saudáveis devem ser retestados após 6 a 8 semanas. Os animais negativos com esta idade que apresentarem-se positivos aos testes e que tiveram contato com animais doentes devem ser retestados após 6 a 8 semanas (44, 52, 65, 66).

A castração; impedir o livre acesso às ruas; o diagnóstico precoce; o isolamento e tratamento dos animais infectados; a lavagem e desinfecção do ambiente, dos acessórios e dos recipientes; bem-estar-animal; e a vacinação são as principais formas de prevenção à infecção por FeLV (44, 52, 65, 66). Vacinas com vírus inativados e recombinantes são encontradas comercialmente e podem reduzir até 70% da incidência da doença (52).

Existem estudos que demonstram uma boa melhora clínica com a utilização de terapias com imunomoduladores como: interferon alfa humano e levamisol – que estimulam o sistema imunológico do animal, reduzindo assim a viremia; interferon tipo I e o interferon ômega que interferem no ciclo de replicação do vírus (44, 71).

Antivirais como AZT, também são utilizados e estudos demonstram que os mesmos, atuam de forma eficaz contra a replicação do FeLV *in vitro* e *in vivo*, e ajudam na melhoria da resposta imunitária e na condição clínica do animal. Os animais infectados devem ser

prontamente tratados para outras infecções, para evitar o comprometimento do sistema imunológico. Portanto, os gatos devem ser vacinados regularmente contra outros patógenos, como o vírus da raiva, panleucopenia felina, rinotraqueíte, calicevirose, clamidiose e outros. Corticosteróides devem ser evitados, mas podem ser utilizados em casos de estomatite ou gengivite para facilitar a ingestão de alimentos. Em casos de anemia, a transfusão sanguínea é útil (65, 66).

### Leucose enzoótica bovina

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma doença viral crônica de bovinos, distribuída mundialmente. A enfermidade é causada por um Deltaretrovírus, o vírus da leucemia bovina (BLV), pertencente ao mesmo gênero que os vírus linfotrópicos T humanos (HTLV) (72). O BLV apresenta menor variabilidade genética que os demais retrovírus, devido à menor taxa de mutação da transcriptase reversa, e infecta, preferencialmente, linfócitos B (72). A infecção natural com BLV ocorre em bovinos, capivaras, bubalinos e ovinos (73).

A leucose enzoótica bovina apresenta alta morbidade. Em rebanhos infectados ela pode atingir uma prevalência de 60 a 90% (74). A prevalência da infecção no mundo varia entre países e regiões, a exemplo temos índices de 28,6% no Japão (75) e 86,7% no Canadá (76). Nos Estados Unidos, um levantamento realizado em 2007 revelou que 83,9% dos rebanhos norte-americanos são positivos para BLV. Na América do Sul, a taxa individual de animais infectados é de 34 a 50% na Colômbia, Venezuela, Chile e Uruguai, e na Argentina é 32,8% (77).

No Brasil, animais infectados já foram detectados em diversos estados, como Minas Gerais (38,7%); Bahia (16,1%); Mato Grosso do Sul (22,0%), Rio Grande do Sul (23,5%); Tocantins (37,0%) entre outros (78). Dados atuais demonstram que a prevalência individual de animais infectados por BLV varia entre os estados com valores em torno de 50% (77). Estes valores de ocorrência variam de acordo com o tipo de rebanho avaliado, leite ou corte e sistema e exploração, extensivo ou intensivo. O maior contato entre os animais, o estresse e a maior manipulação aumentam a taxa de transmissão do vírus. A prevalência é menor em animais jovens, e a incidência de LEB aumenta significativamente entre as idades de 16 a 24 meses (79). A prevalência da infecção é mais elevada em rebanhos leiteiros, resultante das técnicas de manejo comuns nesse tipo de produção (80).

A transmissão do BLV ocorre pela transferência de linfócitos infectados, pois a viremia é rápida. A via de transmissão principal é o sangue, mas qualquer secreção contendo células infectadas podem transmitir o vírus, tais como saliva, secreção nasal e uterina (79). A forma mais importante de transmissão é a horizontal, geralmente pela reutilização de objetos contaminados durante práticas que envolvem contato com sangue, como aplicação de medicamentos, palpação retal, vacinação, descorna, castração, tatuagem ou qualquer procedimento cirúrgico (79). Insetos hematófagos, como a Moscas do cavalo (*Tabanus fuscicostatus*), podem transmitir o vírus em regiões com elevada infestação (80). A transmissão vertical é menos frequente, sendo que a transmissão intrauterina ocorre em cerca de 10% dos animais, geralmente em vacas com linfocitose ou linfomas (81). A infecção pode ocorrer pela ingestão de leite e colostro, mas os anticorpos colostrais podem bloquear a infectividade viral e reduzir a possibilidade de transmissão (82). Apenas o sêmen contendo leucócitos infectados pode transmitir o vírus, geralmente em decorrência de traumas, inflamação ou coleta inadequada (83).

A maioria dos animais infectados não apresenta sinais clínicos. Cerca de 30% dos infectados pode manifestar uma condição denominada linfocitose persistente, resultante do aumento no número de linfócitos B circulantes por períodos prolongados, devido ao desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular. A formação de linfomas pode ser observada em até 5% dos animais acometidos, geralmente após longo período de infecção

(73). As manifestações clínicas resultam da formação de tumores, e dependem da sua localização. Com frequência ocorre invasão do sistema digestório, geralmente no abomaso, resultando em sinais como anorexia, diarreia, timpanismo recorrente e perda de peso. Neoplasias na medula espinhal causam perturbações neurológicas como paralisia de membros posteriores, e linfomas no miocárdio resultam em falência cardíaca (74, 79). As neoplasias podem ser encontradas em outros órgãos como rins, útero e órbita ocular, o que pode levar a exoftalmia (73). Os linfomas são encontrados com maior frequência em animais entre quatro a oito anos de idade, nos quais a doença é geralmente fatal (74).

Anticorpos específicos contra os antígenos virais podem ser detectados entre quatro e 16 semanas após a infecção, e anticorpos maternos desaparecem entre seis a sete meses. O diagnóstico da LEB é essencial para o controle da doença, e deve ser sempre confirmado por exames laboratoriais. A linfocitose persistente pode ser diagnosticada por exames hematológicos. Os métodos sorológicos são amplamente utilizados no diagnóstico da infecção e baseiam-se principalmente na detecção de anticorpos para a glicoproteína do envelope viral gp51 (84).

A técnica mais utilizada é a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), que apresenta especificidade adequada e é uma técnica de fácil realização e baixo custo. Entretanto, em situações como durante o parto e em infecções recentes as técnicas sorológicas podem não ser eficientes, sendo necessária a utilização de técnicas para detecção direta do agente, como o isolamento viral a partir do cultivo *in vitro* de células mononucleares sanguíneas, ou a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar DNA proviral em amostras sanguíneas dos animais infectados (84). A PCR permite a identificação de bezerros infectados mesmo após ingestão de anticorpos colostrais (74).

O controle da LEB é difícil devido à sua ampla distribuição e lenta evolução, e à presença de grande número de animais assintomáticos. O controle das formas de transmissão é a medida mais efetiva, a partir da limpeza e desinfecção de fômites, uso de luvas obstétricas descartáveis, controle de insetos e controle na introdução de novos animais (85). A identificação de animais positivos é necessária para controlar a disseminação e os exames sorológicos devem ser realizados periodicamente. Em rebanhos positivos, pode ser realizada a separação dos animais infectados, além de fornecimento de colostro e leite de vacas não infectadas para bezerros nascidos de vacas infectadas. Essas medidas são eficientes para reduzir a incidência da doença, evitando novas contaminações (81, 85). Em países cujos rebanhos são pequenos, a erradicação da leucose é possível. Esse foi o caso da Dinamarca, país livre da leucose enzoótica bovina atualmente (74).

A infecção pelo BLV leva a prejuízos consideráveis para o produtor e para a indústria, resultantes da morte ou descarte de animais, condenação de carcaças em matadouros, queda na produção de leite, gastos com serviço veterinário e com diagnóstico e tratamento de animais doentes, além de gerar barreiras à exportação de animais e produtos de origem animal (86, 87). A infecção por BLV pode gerar um comprometimento do sistema imune, que pode ocasionar o aparecimento de infecções secundárias devido à imunossupressão, levando a um descarte precoce de animais.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As retrovirose são consideradas de altíssima relevância e uma das mais importantes doenças dos animais domésticos devido ao seu potencial patogênico, associação com doenças oportunistas e grande impacto econômico na pecuária. Além disso, algumas retrovirose tem sido usadas como modelo para estudos da imunodeficiência humana adquirida HIV/AIDs por sua similaridade tanto ao nível de replicação viral como quadro clínico e patogenia que induzem. Outro campo ainda a ser explorado é a infecção de animais silvestres por estes vírus

e qual seria o papel destas espécies na manutenção destes vírus na natureza e/ou surgimento de mutantes capazes de transpor as barreiras das espécies diversificando seu tropismo.

## REFERÊNCIAS

1. Andrioli A, Gouveia AMG, Martins AS, Pinheiro RR, Santos DO. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesqui Agropecu Bras.* 2006;41:1313-9.
2. Brellou GD, Angelopoulou K, Poutahidis T, Vlemmas I. Detection of Maedi-Visna Virus in the liver and heart of naturally infected sheep. *J Comp Pathol.* 2007;136:27-35.
3. Callado AKC, Castro RS, Teixeira MSAS. Lentivírus de pequenos ruminates (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. *Pesqui Vet Bras.* 2001;21:87-97.
4. Castro RS, Leite RC, Resende M, Martins A, Gouveia AMG. Isolamento e identificação pela imunofluorescência indireta e reação em cadeia de polimerase do vírus da artrite-encefalite caprina. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1999;51:235-40.
5. East NE. Caprine arthritis encephalitis. In: Smith BP. *Large animal internal medicine.* St. Louis: Mosby; 1996. p.1147-8.
6. Flores EF. *Virologia veterinária.* Santa Maria: Editora UFSM; 2007.
7. Gouveia AM, Santa Rosa J, Pinheiro RR, Alves FSF, Vidal CES. Implantação de um programa de controle da CAEV em sistemas epidemiológicos distintos. In: *Anais do 23º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 1994, Recife.* Recife, PE: SPEMVE; 1994. p.102.
8. Hanson J, Hydrbring E, Olsson K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritisencephalitis virus. *Acta Vet Scand.* 1996;37:31-9.
9. Lara MCCSH, Birgel Junior EH, Gregory L, Birgel EH. Aspectos clínicos da artrite encefalite dos caprinos. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2005;57:736-40.
10. Lima CCV. Inquérito soropidemiológico da artrite-encefalite caprina na microrregião de Juazeiro - Bahia e comparação de técnicas imunodiagnósticas [dissertação]. Salvador: Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia; 2012.
11. Moojen V, Barth OM, Ravazzolo AP, Von Groll A, Cortes LM, Marchesin DM. Maedi-Visna Virus: first isolation and identification from naturally infected lamb in Brazil. In: *Anais do Congresso Argentino de Virologia; 1996, Tandil.* Tandil, Argentina: Sociedad Argentina de Virologia; 1996. p.89.
12. World Organisation for Animal Health - OIE. Manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestres [Internet]. 2006 [acesso em 2012 Nov 11]. Disponível em: <http://www.oie.int>
13. Pasick J. Maedi-visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Can J Vet Res.* 1998;2:241-4.

14. Pinheiro RR, Gouveia AMG, Alves FSF. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. *Cienc Rural*. 2001;31:449-54.
15. Silva JBA, Lima PM. Lentivírus de pequenos ruminantes: caracterização etiológica, infectividade, controle, prevenção e diagnóstico. *Acta Vet Bras*. 2007;1:111-7.
16. Silva ERV, Menezes AT, Oliveira Filho JP. Artrite encefalite caprina [Internet]. Garça; 2006 [acesso em 2012 Out 10]. *Rev Cient Eletron Med Vet*. 2006. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria06/revisao/revisao03.pdf>
17. Sims LD, Hale CJ, McCormick BM. Progressive interstitial pneumonia in goats. *Aust Vet J*. 1983;60:368-71.
18. Souza TS, Pinheiro RR, Lima CCV, Costa JN. Transmissão interespecies dos lentivírus de pequenos ruminantes: revisão e desafios. *Acta Vet Bras*. 2012;6:23-34.
19. Teixeira MFS, Veronique L, Mselli-Lakahl L, Chebbat A, Chebloune Y, Mornex JF. Immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. *Am J Vet Res*. 1997;58:579-84.
20. Ravazzolo AM, Costa UM. Retroviridae. In: Flores EF. *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM; 2007. p.829-30.
21. Leroux C, Cadoré J, Montelaro RC. Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet Res*. 2004;35:1-19.
22. Craigo JK, Montelaro RC. Encyclopedia of virology. In: *Equine infectious anemia virus*. 3th ed. Pittsburgh: University of Pittsburgh School of Medicine; 2008. v.2, p.167-74.
23. Santos EM, Leite RC, Reis JKP. Anemia infecciosa equina. In: *Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia. retrovíroses de animais domésticos*. 64ª ed. Belo Horizonte: Editora FEPMVZ; 2012. p.73-84.
24. Silva RAMS, Abreu UGP, Barros ATM. Anemia infecciosa equina: epizootiologia, prevenção e controle no Pantanal. Corumbá: Embrapa Pantanal; 2001. Circular Técnica, 29.
25. Reis JKP, Diniz RS, Haddad JP, Ferraz IB, Carvalho AF, Kroon EG, et al. Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. *J Virol Methods*. 2012;180:62-7.
26. Almeida VMA, Gonçalves VSP, Martins MF, Haddad JPA, Dias RA, Leite RC, et al. Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2006;58:141-8.
27. Santos EM, Motta PMC, Heinemann MB, Leite RC, Reis JKP. Avaliação da nested PCR em comparação aos testes sorológicos IDGA e ELISA para o diagnóstico da anemia infecciosa equina. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2011;63:296-301.
28. Oliveira FG. Validação da imunodifusão em gel de ágar para o diagnóstico da anemia infecciosa equina em equídeos e comparação com o elisa rgp90 e imunoblot

- [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia; 2011.
29. Cook RF, Cook SJ, Issel CJ. Equine infectious anaemia. In: Mair TS, Hutchinson RE. Infectious diseases of the horse. Cambridgeshire: Equine Veterinary Journal; 2009. p.56-70.
  30. Dong JB, Zhu W, Cook FR, Goto Y, Horii Y, Haga T. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. Arch Virol. 2012;157:2105-11.
  31. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 45, de 15 de junho de 2004. Aprova as normas para controle da anemia infecciosa equina [Internet]. 2004 [acesso em: 2012 Out 17]. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8136>
  32. Yin H, Li Y, Zou Z, Qiao W, Yao X, Su Y, et al. Inactivation of bovine immunodeficiency virus by photodynamic therapy with HMME. Chin Opt Lett. 2008;6:944-6.
  33. Meas S, Ruas JF, Usui T, Tereaoaka Y, Mulenga A, Chang K, et al. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle. Jpn J Vet Res. 2002;50:9-16.
  34. Corredor AG, St-Louis MC, Archambault D. Molecular and biological aspects of the bovine immunodeficiency virus. Curr HIV Res. 2010;8:2-13.
  35. Belloc C, Polack B, Schwartz-Cornil I, Brownlie J, Lévy D. Bovine immunodeficiency virus: facts and questions. Vet Res. 1996;27:395-402.
  36. Flores E. Virologia veterinária. Rio Grande do Sul: Editora UFSM; 2007.
  37. Andrews AH, Blowey RW, Bloyd H, Eddy RG. Medicina bovina: doença e criação de bovinos. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2008.
  38. Brujeni GK, Poorbazargani T, Nadin-Davis S, Toloie M, Barjesteh N. Bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus and their mixed infection in Iranian Holstein cattle. J Infect Dev Ctries. 2010;4:576-9.
  39. Snider TG, Luther DG, Jenny BF, Hoyt PG, Battles JK, Ennis WH, et al. Encephalitis, lymphoid tissue depletion and secondary diseases associated with bovine immunodeficiency virus in a dairy herd. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1996; 19:117-31.
  40. Moody CA, Pharr GT, Murphey J, Hughlett MB, Weaver CC, Nelson PD, et al. Confirmation of vertical transmission of bovine immunodeficiency virus in naturally infected dairy cattle using the polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest. 2002; 14:113-9.



41. McNab WB, Jacobs RM, Smith HE. A serological survey for bovine immunodeficiency-like virus in Ontario dairy cattle and associations between test results, production records and management practices. *Can J Vet Res.* 1994;58:36-41.
42. 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;62:779-81.
43. Daffner J, Scortti M. Bovine immunodeficiency virus. *Arch Med Vet.* 1997;29:5-11.
44. Alves F, Reis JKP. Feline immunodeficiency. In: Metodiev K. *Immunodeficiency.* Rijeka: In Tech; 2012. p.357-74.
45. Alves F. Padronização de um Elisa indireto para o diagnóstico da imunodeficiência felina a vírus [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia; 2010.
46. Sellon RK, Hartmann K. Feline immunodeficiency virus infection. In: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat.* 3ª ed. St Louis: Elsevier; 2006. p.131-42.
47. Hartmann K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *Vet J.* 1998;155:123-37.
48. Hosie MJ, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, et al. Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 2009;11:575-84.
49. Lazo PA, Tschilis PN. Biology and pathogenesis of retroviruses. *Semin Oncol.* 1990;17:269-94.
50. Braz GF, Rajão DS, Del Puerto HL, Almeida NR, Mazur C. Leucemia viral felina. In: *Retrovírus de animais domésticos.* Belo Horizonte: Editora FEPMVZ; 2012. p.23-34.
51. Rajão DS, Braz GF, Alves F, Almeida NR, Mazur C. Imunodeficiência viral felina. In: *Retrovírus de animais domésticos.* Belo Horizonte: Editora FEPMVZ; 2012. p.10-22.
52. Ravazollo AP, Costa U. Retroviridae. In: Flores EF. *Virologia veterinária.* Rio Grande do Sul: UFSM; 2007. p.809-38.
53. Pedersen NC, Ho EW, Brown ML, Yamamoto JK. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science.* 1987;235:790-3.
54. Kurosawa K, Ikeda Y, Miyazawa T, Izumiya Y, Nishimura Y, Nakamura K, et al. Development of restriction fragment-length polymorphism method to differentiate five subtypes of feline immunodeficiency virus. *Microbiol Immunol.* 1999;43:817-20.
55. Kenyon JC, Lever AM. The molecular biology of feline immunodeficiency virus (FIV). *Viruses.* 2011;3:2192-213.
56. Yamamoto JK, Hansen H, Ho EW, Morishita TY, Okuda T, Sawa TR, et al. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats

- from the Continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J Am Vet Med Assoc.* 1989;194:213-20.
57. Hosie MJ, Robertson C, Jarrett O. Prevalence of feline leukemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. *Vet Rec.* 1989;125: 293-7.
  58. Alves F, Rajão DS, Del Puerto HL, Braz GF, Leite RC, Mazur C, et al. Occurrence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection in cats. *Am J Anim Vet Sci.* 2011;6:125-9.
  59. Medeiros SO, Martins AN, Dias CG, Tanuri A, Brindeiro RD. Natural transmission of feline immunodeficiency virus from infected queen to kitten. *Virology.* 2012;9:99.
  60. Elder JH, Sundstrom M, de Rozières S, de Parseval A, Grant CK, Lin YC. Molecular mechanisms of FIV infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;123:3-13.
  61. Hartmann K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;143:190-201.
  62. Olmsted RA, Hirsch VM, Purcell RH, Johnson PR. Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:8088-92.
  63. Jarrett WF, Crawford EM, Martin WB, Davie F. A virus-like particle associated with leukaemia (lymphosarcoma). *Nature.* 1964;202:567-9.
  64. Overbaugh J, Bangham CRM. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science.* 2001;292:1106-9.
  65. Hartmann K. Feline leukemia virus infection. In: Greene CE. *Infectious disease of the dog and cat.* 3<sup>a</sup> ed. Georgia: Elsevier; 2006. p.105-31.
  66. Lutz H, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, et al. Feline leukemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 2009;11:565-74.
  67. Hardy Jr WD, Hess PW, MacEwen EG, McClelland AJ, Zuckerman EE, Essex M, et al. Biology of feline leukemia virus in the natural environment. *Cancer Res.* 1976;36:582-8.
  68. Lutz H. Feline retroviruses: a brief review. *Vet Microbiol.* 1990;23:131-46.
  69. Hardy Jr WD. General principles of retrovirus immunodetection tests. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;199:1282-7.
  70. Herring IP, Troy GC, Toth T. Feline leukemia virus detection in corneal tissues of cats by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Vet Ophthalmol.* 2001;4:119-26.
  71. Collado VM, Gómez-Lucía E, Tejerizo G, Miró G, Escolar E, Martín S, et al. Effect of type I interferons on the expression of feline leukaemia virus. *Vet Microbiol.* 2007; 123:180-6.

72. Goff SP. Retroviridae: the retroviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 5ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. v.2, p.1999-2069.
73. Camargos MF, Reis JKP, Leite RC. Bovine leukemia virus. *Virus Rev Res.* 2004;9:44-59.
74. Leuzzi Junior LA, Alfieri AF, Alfieri AA. Enzootic bovine leukosis and Bovine leukemia virus. *Semin Cienc Agrar.* 2001;22:211-21.
75. Murakami H, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Tsotsui T. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Vet Microbiol.* 2011;148:84-8.
76. Scott HM, Sorensen O, Wu JTY, Chow EYW, Manninen K, Vanlewen JA. Seroprevalence of Mycobacterium avium subspecies, paratuberculosis, Neospora caninum, bovine leukemia virus and bovine viral diarrhoea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. *Can Vet J.* 2006;47:981-91.
77. Rodriguez SM, Florins A, Nicolas G, Brogniez A, Sanchez-Alcaez MT, Boxus M, et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses.* 2011;3:1210-48.
78. Fernandes CHC. Leucose enzoótica dos bovinos: soroprevalência, fatores de risco e níveis séricos de lisozima em bovinos leiteiros do Estado do Tocantins, Brasil [tese]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2007.
79. Johnson R, Kaneene JB. Bovine leukemia virus. Part I. Descriptive epidemiology, clinical manifestations, and diagnostic tests. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1991;13:315-24.
80. Hopkins SG, DiGiacomo RF. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1997;13:107-28.
81. DiGiacomo R. Horizontal transmission of the bovine leukemia virus. *Vet Med.* 1992; 87:263-71.
82. Ferrer JF, Piper C. Role of colostrum and milk in the natural transmission of the bovine leukemia virus. *Cancer Res.* 1981;41:4906-9.
83. Dus Santos MJ, Trono K, Lager I, Eaves LE. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet Microbiol.* 2007;39:313-21.
84. Camargos MF, Oliveira Junior AC, Cruz JCM, Lessa LM, Rocha MA, Stancek D, et al. Testes diagnósticos para o vírus da leucose bovina. *Rev Bras Cienc Vet.* 2005;12:149-50.
85. Johnson R, Kaneene J. Bovine leukemia virus. Part II. Risk factors of transmission. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1991;13:681-91.

86. Pelzer KD. Economics of bovine leukemia virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1997;13:129-41.
87. Ott SL, Johnson R, Wells SJ. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Vet Med.* 2003;61:249-62.

**Recebido em: 21/01/13**

**Aceito em: 28/02/13**

## PATOGÊNESE DA ENTEROPATIA PROLIFERATIVA SUÍNA – REVISÃO DE LITERATURA

Carlos Eduardo Real Pereira<sup>1</sup>  
Fabio Augusto Vannucci<sup>2</sup>  
João Carlos Pereira da Silva<sup>3</sup>  
Roberto Maurício Carvalho Guedes<sup>4\*</sup>

### RESUMO

A enteropatia proliferativa, causada pela *Lawsonia intracellularis*, é uma doença entérica com distribuição mundial que afeta uma variedade de animais, principalmente os suínos. Apesar das dificuldades de isolamento da *L. intracellularis*, alternativas no cultivo e desenvolvimento de modelos experimentais utilizando culturas puras tornou-se possível uma melhor caracterização da patogênese desta condição mórbida, pelas interações *in vivo* e *in vitro* entre a bactéria e a célula hospedeira. Sabe-se da capacidade da *L. intracellularis* infectar células das criptas intestinais mitoticamente ativas e, em seguida, multiplicar e propagar nas células originadas da divisão. Após o sucesso do crescimento e manutenção *in vitro* da *L. intracellularis*, vários estudos tornaram-se possíveis de serem realizados, entretanto a continuidade de pesquisas nesta área é requerida a fim de melhor compreender detalhes da patogênese desta bactéria.

**Palavras-chave:** *Lawsonia intracellularis*, patogênese, ileíte, diarreia

### PATHOGENESIS OF PORCINE PROLIFERATIVE ENTEROPATHY - REVIEW

#### ABSTRACT

Proliferative enteropathy is a widespread enteric disease caused by *Lawsonia intracellularis* that infects a variety of animals, most notably pigs. Despite extreme difficulties in isolating *L. intracellularis*, innovations in the cultivation and the development of pure culture challenge models, have opened doors to better characterization of the pathogenesis of proliferative enteropathy *in vivo* and *in vitro*. The ability of *L. intracellularis* to infect dividing enterocytes in the intestinal crypts and then multiply and spread in these cells is well-described. After the successful growth and maintenance of *L. intracellularis in vitro*, several advances became possible but more studies have to be conducted in order to better understand the pathogenesis of *L. intracellularis* infections.

**Keywords:** *Lawsonia intracellularis*, pathogenesis, ileitis, diarrhea

### PATOGÊNESE DE LA ENTEROPATÍA PROLIFERATIVA PORCINA – REVISIÓN DE LA LITERATURA

#### RESUMÉN

La enteropatía proliferativa, causada por *Lawsonia intracellularis*, es una enfermedad entérica con distribución mundial que afecta una grande variedad de animales, especialmente cerdos.

<sup>1</sup> Mestrando em Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG – Belo Horizonte – MG - Brasil

<sup>2</sup> Doutorando em Patobiologia da University of Minnesota – St. Paul – MN – Estados Unidos

<sup>3</sup> Professor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG - Brasil

<sup>4</sup> Professor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte – MG - Brasil

\* Autor para correspondência: Roberto M. C. Guedes. Email: guedesufmg@gmail.com Endereço: Depto. de Clínica e Cirurgias Vet. EV-UFMG – Av. Antonio Carlos, 6627 – Belo Horizonte – MG – Brasil. CEP: 30123-970 Tel.: (31) 3409-2258.

A pesar de las dificultades de aislamiento y cultivo de *L. intracellularis*, las alternativas en el cultivo y el desarrollo de modelos experimentales utilizando cultivos puros tornaron posible una mejor caracterización de la patogénesis de esta condición mórbida a través de interacciones in vivo e in vitro entre bacterias y células huéspedes. Es bien conocida la capacidad de *L. intracellularis* para infectar células de las criptas intestinales con actividad mitótica, seguida por su multiplicación y propagación en las células resultantes de esta división. El cultivo y mantenimiento exitosos in vitro de *L. intracellularis* posibilitó la realización de diversos estudios. Sin embargo, para comprender mejor los detalles de la patogénesis de esta bacteria es necesario continuar con la investigación en esta área.

**Palabras clave:** *Lawsonia intracellularis*, patogénesis, ileitis, diarrea

## INTRODUÇÃO

A *Lawsonia intracellularis* é uma bactéria gram negativa, intracelular obrigatória, microaerófila, móvel e causadora da enteropatia proliferativa suína (EPS) (1).

De acordo com McOrist e Gebhart (2) a EPS tem duas formas mais frequentes de apresentação: a forma crônica conhecida como adenomatose intestinal suína observada mais comumente em animais de crescimento entre 6 e 20 semanas de idade e caracterizada por anorexia, diarréia e redução do ganho de peso. A forma aguda, também conhecida como enteropatia proliferativa hemorrágica, acomete animais mais velhos de 4 a 12 meses e é caracterizada por fezes enegrecidas (melena) e morte súbita. Existe ainda a forma subclínica em que não se observam sinais clínicos, mas tem grande importância epidemiológica pela possibilidade de ocorrer a disseminação silenciosa do agente.

Macroscopicamente, as lesões características da enteropatia proliferativa são usualmente encontradas no íleo embora, com menor frequência, possam ser encontradas no ceco, colón e jejuno. Na forma aguda as lesões são caracterizadas por edema e hiperemia do mesentério e espessamento da parede intestinal. A mucosa se apresenta com pregas evidentes e conteúdo hemorrágico pode ser observado no lúmen intestinal (3). Já a forma crônica, consiste em edema de mesentério, aspecto cerebróide da serosa intestinal, espessamento da mucosa intestinal e presença de membrana necrótica aderida a mucosa.

Em linhas gerais o aspecto histológico de ambas as formas tem as mesmas características. Pode ocorrer proliferação dos enterócitos das criptas no intestino delgado e, às vezes, presença da bactéria no ápice dos enterócitos quando se utiliza técnicas especiais de coloração como a prata. As vilosidades se apresentam atrofiadas com reduzido número de células caliciformes e a presença de células inflamatórias não é observada com frequência. Uma distinção que caracteriza a forma aguda é a observação de acentuada hiperemia da mucosa e acúmulo de sangue no lúmen intestinal (2).

A diarréia observada em animais de recria e terminação pela sua baixa especificidade necessita da coleta de amostras para exames complementares. Fragmentos intestinais fixados em formol para coloração de rotina (H&E), colorações especiais (impregnação pela prata) e imuno-histoquímica (3-5) permitem chegar ao diagnóstico definitivo. Alternativamente, podem ser usadas outras técnicas diagnósticas *ante mortem*, para isso torna-se necessário amostras de fezes ou soro, a serem avaliados pela PCR e IPMA (do inglês, *Immunoperoxidase monolayer assay*), respectivamente (6, 7). Tratam-se de testes altamente específicos para, respectivamente, detecção de regiões específicas presente no genoma da bactéria e de anticorpos IgG contra *L. intracellularis*.

A enteropatia proliferativa é melhor descrita e caracterizada nos suínos embora possa afetar inúmeras espécies tais como camundongos, hamster, coelhos, cães, cavalos, macacos entre outros (8, 9). A infecção ocorre por via fecal-oral com animais acometidos eliminando grandes quantidades de *L. intracellularis* chegando a ordem de  $10^8$  por grama de fezes e por

longo período (10). Pequena quantidade da bactéria é capaz de induzir a infecção contribuindo assim para alta prevalência da enfermidade em rebanhos suínos em todo o mundo.

Apesar do grande número de pesquisas sobre a patogênese da enteropatia proliferativa, ainda, existem alguns processos pouco conhecidos sobre a capacidade de infecção da *L. intracellularis* e sua interação com as células do hospedeiro.

## REVISÃO DE LITERATURA

Após o sucesso no cultivo e propagação da *L. intracellularis in vitro* (11), recentemente foram desenvolvidos métodos alternativos (12), que tornaram possível o estudo dos mecanismos envolvidos na penetração do agente em células eucariotas, bem como, acompanhar a evolução do processo e dimensionar a multiplicação dessas bactérias. Exame de cultura de células infectadas pela *L. intracellularis* tem mostrado a capacidade da bactéria de ser internalizada rapidamente, podendo ser observada, intracelularmente, na primeira hora após a infecção em células susceptíveis. Para isso, a bactéria interage intimamente com a membrana da célula hospedeira e é internalizada no interior de vacúolos citoplasmáticos (13). Três horas após a inoculação podem ser observadas bactérias, ainda no interior de vacúolos, iniciando sua propagação no citoplasma das células. Do segundo ao sexto dia após a incubação é possível observar bactérias livres no citoplasma multiplicando-se por fissão binária. (11, 13).

Apesar de ainda não terem sido identificadas, a penetração da bactéria parece exigir interações específicas com a célula hospedeira (14). Recentemente, Vannucci et al. (15), ao realizar um estudo experimental utilizando cepas de *L. intracellularis* provenientes de porco e suíno observaram a espécie-especificidade desses diferentes isolados.

A sequência do genoma da *L. intracellularis* indica que, esta bactéria, pode possuir um sistema de secreção do tipo III, comumente encontrado em bactérias patogênicas gram-negativas, que poderia auxiliar a bactéria durante a invasão celular e a evasão do sistema imune do hospedeiro, liberando fatores proteicos diretamente no citoplasma das células eucariotas. Este mecanismo pode ser um importante fator de patogenicidade da bactéria (16). Lawson et al. (17), ao estudarem *in vitro* diversas variáveis que poderiam influenciar a internalização e propagação da bactéria, observaram inibição da propagação da *L. intracellularis*, quando utilizaram cicloheximida e colquicina, substâncias que atuam inibindo a divisão celular. Tal fato indica que a proliferação da bactéria depende intimamente do perfil metabólico das células hospedeiras e que as mesmas sejam mitoticamente ativas. As atividades citolítica e hemolítica foram demonstradas em estudos *in vitro* e *in vivo*, as quais, possivelmente, estejam associadas ao processo de penetração da bactéria nas células eucariotas (18, 19).

A reprodução experimental da enteropatia proliferativa utilizando culturas puras de *L. intracellularis* ou por meio de homogeneizado de mucosa de suínos com a enfermidade demonstraram ter eficácia similar no aparecimento e intensidade de sinais clínicos e lesões característicos da doença (20). As lesões macro e microscópicas se iniciam na segunda semana após a infecção, estudos experimentais demonstraram que o pico da doença é entre três e quatro semanas após a inoculação e a excreção das bactérias é detectada por quatro semanas, podendo chegar a até 10 semanas (21, 22). Estudos recentes demonstraram, por meio de avaliação experimental, a interação entre a bactéria e os enterócitos aproximadamente 12 horas após a inoculação por via oral (23). Deve ser registrado, no entanto, que esse período pode ser abreviado utilizando, *in vivo*, modelos experimentais com ligaduras de fragmentos de intestino e fazendo a inoculação direta nos fragmentos, resultando em interação em torno de três horas após a inoculação (24).

De forma semelhante aos eventos *in vitro*, dois a seis dias após a inoculação é possível observar a multiplicação das bactérias no citoplasma que, posteriormente, irão determinar o rompimento da membrana citoplasmática das células e liberação dos micro-organismos para o meio extracelular, ocasião em que estarão aptas a infectar novas células (8). Boutrup et al. (23) usando a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), observaram a presença da *L. intracellularis* viáveis na lâmina própria e no interior de células mononucleares. Esta técnica consiste na utilização de uma sonda de oligonucleotídeos conjugada a um fluorocromo que tem como alvo o gene 16s do rRNA. A utilização deste alvo justifica-se pelo fato de todas as células necessitarem de ribossomos para a tradução, portanto, podem estar presentes em grandes quantidades em todas as células metabolicamente ativas (25). Por conseguinte, essa pode ser uma via alternativa na disseminação da infecção entre enterócitos.

A enteropatia proliferativa se inicia com a proliferação de enterócitos imaturos do intestino delgado e, por vezes, no intestino grosso quando há a migração aboral da bactéria facilitada pelo fluxo do muco (26). Em muitos casos são observadas reações inflamatórias de baixa intensidade (21). No entanto, a inflamação não é uma característica primária da infecção. Em estudo experimental utilizando hamsters, Johnson e Jacob (27) observaram que enterócitos imaturos do íleo, proliferam e chegam aos topos das vilosidades em até 14 dias após a infecção. A hiperplasia de enterócitos, associados a presença da *L. intracellularis* em hamsters, pôde ser observada por mais de 40 dias após o desafio utilizando homogeneizado de mucosa acometida por enteropatia proliferativa (28, 29). Em raros casos de enteropatia proliferativa, *L. intracellularis* pode ser observada em linfonodos mesentéricos e tonsilas, porém, aparentemente, não há proliferação bacteriana nestes locais, sugerindo que a ocorrência é resultante da inativação e degradação do micro-organismo por macrófagos (30). Ao contrário dos estudos *in vivo*, a proliferação celular não pode ser reproduzida *in vitro*. Alterações no índice de células em apoptose, com resultados contraditórios, já foram sugeridos em estudos anteriores (21, 31, 32), necessitando de futuros estudos para avaliar, de forma mais precisa, a proliferação celular e o papel da apoptose de enterócitos durante a infecção pela *L. intracellularis*.

Vannuci et al. (33) em um estudo *in vivo* utilizando hamsters como hospedeiro e homogeneizado de mucosa de suínos diagnosticados com EPS como inóculo para avaliação da patofisiologia da diarreia por *L. intracellularis* observaram uma redução significativa na absorção de glicose e dos eletrólitos avaliados ( $K^+$  e  $Cl^-$ ). Fatos que evidenciam ser a diarreia malabsortiva o principal processo envolvido na fisiopatologia da diarreia causada pela EPS, o que explica a perda de desempenho dos suínos acometidos pela *L. intracellularis*.

Para manutenção e propagação da cultura pura de *L. intracellularis in vitro* são necessárias passagens semanais em cultivo de células, que ao atingirem 100% de confluência, torna-se necessário a transferência da cultura da bactéria para novo frasco de cultivo com baixa confluência. Tal procedimento pode ser um fator a diminuir a patogenicidade da bactéria por adaptação as condições *in vitro* causadas principalmente por mutações genéticas ou mudanças na regulação da expressão gênica (34). Estudo *in vivo* demonstrou diferenças significativas entre a quantidade de bactérias eliminadas pelas fezes, intensidade da resposta imune, dos sinais clínicos e de lesões quando comparado a inoculação de cultura pura com 10, 20 e 40 passagens. Cumpre destacar que, com 10 e 20 passagens *in vitro* houve a reprodução da EPS, o que não foi observado nos suínos inoculados com cultura pura de *L. intracellularis* após 40 passagens *in vitro* (35). Complementando, em outro estudo, Vannucci, Foster e Gebhart (36) compararam a capacidade de transcrição de homólogos patogênicos (10 passagens) e não patogênicos (60 passagens). Observaram diferença em categorias funcionais que foram mais pronunciadas na adaptação, resposta ao stress, membrana celular, motilidade, transporte de membrana, biossíntese de micro e macromoléculas e divisão celular. Em todas essas categorias a cepa patogênica apresentou maior número de genes expressados. Esses



resultados indicam que os mecanismos envolvidos na patogenicidade da *L. intracellularis* parecem ser mais complexos do que previamente especulado

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos diversos estudos recentes a respeito da patogênese da *L. intracellularis* terem sido realizados, a continuidade das pesquisas nesta área é imprescindível no sentido de desenvolver novos conhecimentos visando subsidiar o melhor entendimento no que se refere a internalização e propagação da bactéria.

## REFERÊNCIAS

1. Lawson GHK, McOrist S. The enigma of the proliferative enteropathies: a review. *J Comp Pathol.* 1993;108:41-6.
2. McOrist S, Gebhart CJ. Porcine proliferative enteropathies. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. *Diseases of swine.* 8ª ed. Ames: Iowa State University Press; 1999. p.521-34.
3. Ward GE, Winkelman NL. Recognizing the three forms of PE in swine. *Vet Med.* 1990;8:197-203.
4. Rowland AC. Necrotic enteritis and regional ileitis in pigs at slaughter. *Vet Rec.* 1978;91:338-9.
5. Guedes RMC, Gebhart CJ. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. *J Vet Diagn Invest.* 2003;15:438-46.
6. Gebhart CJ, Lin GF, McOrist S, Lawson GH, Murtaugh MP. Cloned DNA probes specific for the intracellular *Campylobacter* – like organism of porcine proliferative enteritis. *J Clin Microbiol.* 1991;29:1011-5.
7. Guedes RMC, Gebhart CJ, Winkelman NA, Mackie-Nuss RA, Marsteller TA, Deen J. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Can J Vet Res.* 2002;66:99-107.
8. Lawson GHK, Gebhart CJ. Proliferative enteropathy: review. *J Comp Pathol.* 2000;122:77-100.
9. Dauvillier J, Picandet V, Harel J, Gottschalk M, Desrosiers R, Jean D, et al. Diagnostic and epidemiological features of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in 2 foals. *Can Vet J.* 2006;47:689-91.
10. Guedes RMC. Enteropatia proliferativa suína. In: Sobestiansky J, Barcellos D, editors. *Doenças dos suínos.* Goiânia: Cãnone Editorial; 2007. p.109-17.
11. Lawson GHK, McOrist S, Jasni S, Mackie RA. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1136-42.

12. Vannucci FA, Wattanaphansak S, Gebhart CJ. An alternative method for cultivation of *Lawsonia intracellularis*. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1070-2.
13. McOrist S, Jasni S, Mackie RAM, Berschneider HM, Rowland AC, Lawson GHK. Entry of the bacterium ileal symbiont *intracellularis* into cultured enterocytes and its subsequent release. *Res Vet Sci*. 1995;59:255-60.
14. McOrist S, Mackei RAM, Lawson GHK, Smith DGE. In-vitro interactions of *Lawsonia intracellularis* with cultured enterocytes. *Vet Microbiol*. 1997;54:385-92.
15. Vannucci FA, Pusterla N, Mapes SM, Gebhart CJ. Evidence of host adaptation in *Lawsonia intracellularis* interaction. *Vet Res*. 2012;20:43-53.
16. Kroll JJ, Roof MB, Hoffman LJ, Dickson JS, Harris DLH. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Anim Health Res Rev*. 2005;6:173-97.
17. Lawson GHK, Mackie RAM, Smith DGE, McOrist S. Infection of cultured rat enterocytes by ileal symbiont *intracellularis* depends on host cell function and actin polymerization. *Vet Microbiol*. 1995;45:339-50.
18. Hannigan J. Identification and preliminary characterization of *Lawsonia intracellularis* cytolytic activity M.Sc [thesis]. Edinburgh: University of Edinburgh; 1997.
19. McCluskey J, Hannigan J, Harris JD, Wren B, Smith DGE. LsaA, an antigen involved in cell attachment and invasion, is expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection in vitro and in vivo. *Infect Immun*. 2002;70:2899-907.
20. Guedes RMC, Gebhart CJ. Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. *Vet. Microbiol*. 2003;93:159-66.
21. McOrist S, Roberts L, Jasni S, Rowland AC, Lawson GHK, Gebhart CJ, et al. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenic mechanisms. *J Comp Pathol*. 1996;115:35-45.
22. Smith SH, McOrist S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Res Vet Sci*. 1997;62:6-10.
23. Boutrup TS, Boesen HT, Boye M, Agerholm JS, Jensen TK. Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J Comp Pathol*. 2010;143:101-9.
24. Boutrup TS, Schauser K, Agerholm JS, Jensen TK. Application of pig ligated intestinal loop model for early *Lawsonia intracellularis* infection. *Acta Vet Scand*. 2010;52:17-24.
25. Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification by improved FISH. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:339-48.
26. Jensen TK, Christensen BB, Boye M. *Lawsonia intracellularis* infection in the large intestines of pigs. *APMIS: Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2006;114:255-64.

27. Johnson EA, Jacob RO. Transmissible ileal hyperplasia of hamster. *Am J Pathol.* 1978;91:451-68.
28. Frisk C. The etiology and pathogenesis of hamster enteritis [thesis]. Missouri: University of Missouri; 1976.
29. Jacoby RO. Transmissible ileal hyperplasia of hamster. *Am J Pathol.* 1978;91:433-44.
30. Jensen TK, Moller K, Lindercona R, Jorsal SE. Detection of *Lawsonia intracellularis* in the tonsils of pigs with proliferative enteropathy. *Res Vet Sci.* 2000;68:23-6.
31. Machuca MA, Quiroga MA, Riganti J, Massone AR, Idiart JR, Amocida AD, et al. Porcine proliferative enteropathy: immune-labeling of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis. In: *Anais do 9º Encontro Nacional de Patologia Veterinária; 1999, Belo Horizonte. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1999. p.11.*
32. Guedes RMC. Porcine proliferative enteropathy: diagnosis, immune response and pathogenesis [thesis]. St. Paul: University of Minnesota; 2002.
33. Vannucci FA, Borges EL, Oliveira JSV, Guedes RMC. Intestinal absorption and histomorphometry of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Lawsonia intracellularis*. *Vet Microbiol.* 2010;145:286-91.
34. Fux CA, Shirliff M, Stoodley P, Costerton JW. Can laboratory reference strains mirror “real world” pathogenesis? *Trends Microbiol.* 2005;13:58-63.
35. Vannucci FA, Beckler D, Pusterla N, Mapes SM, Gebhart CJ. Attenuation of virulence of *Lawsonia intracellularis* after in vitro passages and its effects on the experimental reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet Microbiol.* 2012;162:265-9.
36. Vannucci FA, Foster DN, Gebhart CJ. Comparative transcriptional analysis of homologous pathogenic and non-pathogenic *Lawsonia intracellularis* isolates in infected porcine cells. *PloS One.* 2012;7:e46708.

**Recebido em: 04/02/13**

**Aceito em: 04/03/13**

**PARASITISMO POR CARRAPATOS EM ANUROS NO BRASIL. REVISÃO**

Hermes Ribeiro Luz<sup>1</sup>  
João Luiz Horácio Faccini<sup>1</sup>

**RESUMO**

Vários endo e ectoparasitas já foram registrados em anuros: bactérias, fungos, protozoários, helmintos e artrópodes. Contudo, apesar do grande número de espécies de carrapatos existentes, apenas seis foram registradas parasitando anuros do gênero *Rhinella* no Brasil, sendo *Amblyomma dissimile* e *Amblyomma rotundatum* as mais comuns. Ambas espécies apresentam três estágios no desenvolvimento de seu ciclo vital (larva, ninfa e adulto), sendo que todos são ativos e dependem do repasto sanguíneo para desempenho pleno de suas funções biológicas. Existem diversos grupos de ectoparasitas de anfíbios atuando como vetores de agente infecciosos: Sanguessugas (*Batrachobdella picta*) transmitindo tripanosomas para *R. clamitans*, *R. catesbeiana* e *R. setentrionales*, *Hyla crucifer*, *R. americanus*, *R. sylvatica* e *Plethodon cinereus*. Mosquitos do gênero *Phlebotomus* transmitindo tripanosomas em rãs na China e o carrapato *A. rotundatum* transmitindo *Hemolivia* e *Hepatozon*. *A. dissimile* é vetor *Hepatozoon fusifex*. Além dos protozoários, há relatos também da infecção por *Rickettsia belli* em ambas espécies *A. rotundatum* e *A. humerale*. Os carrapatos podem causar lesões nos sapos durante o repasto sanguíneo resultando no aparecimento de lesões ulcerativas e hemorragias.

**Palavras-chave:** anuros, parasitismo, carrapatos.

**TICKS PARASITIZING ANURANS IN BRAZIL. REVIEW****ABSTRACT**

In the toads there have been recorded several endo and ectoparasites: bacteria, fungi, protozoa, helminths and arthropods. However, despite the hundreds of species of ticks described, only six were recorded from toads of the genus *Rhinell*. in Brazil, *Amblyomma dissimile* and *Amblyomma rotundatum* are the most common. Both species have three stages in their life cycle (larva, nymph and adult), all of which are active and depend on a blood meal to perform its biological functions. There are several groups of ectoparasites in amphibians acting as vectors of infectious agents: *Batrachobdella picta* transmitting trypanosomes to *R. clamitans*, *R. catesbeiana* and *R. setentrionales*, *Hyla crucifer*, *R. americanus*, *R. sylvatica* and *Plethodon cinereus*. Mosquitoes of the genus *Phlebotomus* transmitting trypanosomes to frogs in China, *A. rotundatum* transmitting *Hemolivia* and *Hepatozon* and *A. dissimile* vectoring *Hepatozoon fusifex*. Besides the protozoa, there are also reports of infection by *Rickettsia belli* in both *A. rotundatum* and *A. humerale*. Ticks can also cause lesions in toads during the blood meal resulting in the development of ulcerative lesions and bleeding.

**Keywords:** anurans, parasitism, ticks.

<sup>1</sup> Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 23890-000, Brazil. Corresponding author: e-mail: hermes@ufrj.br

## PARASITISMO POR GARRAPATAS EN ANUROS EN BRASIL

### RESUMEN

Varios endoparásitos y ectoparásitos han sido encontrados en los anuros incluyendo bacterias, hongos, protozoarios, helmintos y artrópodos. Aún así, a pesar del gran número de especies de garrapatas, solamente seis han sido registradas como parásitos de anuros del género *Rhinella* en Brasil, entre las que se encuentran, como las más comunes, *Amblyomma dissimile* y *Amblyomma rotundatum*. Ambas especies presentan tres etapas durante su desarrollo (larva, ninfa y adulto). La garrapata se encuentra activa durante todas estas etapas y dependen del consumo de sangre para el pleno desempeño de sus funciones biológicas. Existen diversos grupos de ectoparásitos de anfibios que actúan como vectores de agentes infecciosos: sanguijuelas (*Batrachobdella picta*) que transmite tripanosomas para *R. clamitans*, *R. catesbeiana* y *R. setentrionalis*, *Hyla crucifer*, *R. americanus*, *R. sylvatica* y *Plethodon cinereus*. Mosquitos del género *Phlebotomus* que transmiten tripanosomas en ranas en China y la garrapata *A. rotundatum* que transmite Hemolivia y Hepatozoon. *A. dissimile* es el vector de *Hepatozoon fusifex*. Además de los protozoarios, existen también reportes de infección por *Rickettsia belli* en *A. rotundatum* y *A. humerale*. Las garrapatas pueden causar laceraciones en los sapos durante el consumo sanguíneo lo que provoca lesiones ulcerativas y hemorrágicas.

**Palabras clave:** anuros, parasitismo, garrapatas.

### INTRODUÇÃO

A ordem Anura (sapos, rãs e pererecas) é a única, dentre os anfíbios, com registros da associação com carrapatos, sendo a família Bufonidae, representada no continente sul americano pelo gênero *Rhinella* (= *Bufo*, *Chaunus*), a que possui maior número de registros de associação com carrapatos. No entanto, informações sobre a relação parasito-hospedeiro em anuros no Brasil são escassas, sendo a grande maioria das publicações restritas a notificações isoladas de ocorrência com um número reduzido de hospedeiros e carrapatos. Muitos destes relatos se concentram nas regiões sul e sudeste, com raros registros para as demais regiões.

### HOSPEDEIROS

Os anfíbios se definem como animais que, durante a fase larvária, tem vida aquática (com brânquias e nadadeiras) e uma vez adulto, passam a viver em terra, perdendo por metamorfose as brânquias e nadadeiras, e desenvolvendo pulmões e pernas. Possuem respiração cutânea para compensar a respiração pulmonar precária. Reproduzem-se na água por fecundação externa, sendo ovíparos. A classe Amphibia é composta pelas ordens Anura (sapos, pererecas e rãs), Caudata (salamandras) e Gymnophiona (cobras-cegas) (2-3). Quase todas as espécies dependem de ambientes úmidos e habitats de água doce para sobreviver e reproduzir. A maior diversidade de anfíbios se encontra nas florestas tropicais, enquanto nas regiões temperadas e áridas as populações desses animais são reduzidas. Não existe anfíbios em ambientes marinhos (3, 31).

Os anfíbios são sensíveis a perturbações do ambiente e, portanto, indicadores da qualidade de um determinado habitat. Mais de 6.000 espécies são conhecidas pela ciência, das quais 168 são consideradas extintas e pelo menos 2.469 (41%) espécies estão em declínio da população (3, 31). Quase um terço das espécies de anfíbios do mundo estão ameaçadas, representando 1.896 (32%) espécies. Em comparação, apenas 12% de todas as espécies de aves e 23% de todas as espécies de mamíferos estão ameaçadas (3, 31).

Várias pesquisas foram iniciadas para explicar porque algumas populações mundiais de anfíbios estão em declínio e constatou-se que flutuações naturais das populações, mudanças climáticas, aumento da incidência de raios ultravioletas, poluição das águas, contaminação por pesticidas, espécies invasoras, comércio ilegal de animais silvestres e infecções por fungos quitrídios são algumas das causas que podem estar levando ao declínio ou talvez extermínio da anurofauna (5). Embora a perda de habitat claramente represente a maior ameaça para os anfíbios, uma das causas mais ameaçadoras é o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, descrito em 1998 por pesquisadores australianos como um fungo letal para anuros (2, 5, 46).

Dentre os anfíbios registrados em todo mundo, a família Bufonidae Gray, 1825 se destaca em sua representatividade sendo constituída por 49 gêneros e 582 espécies (3, 31). Este grupo distribui-se pelas regiões tropicais e temperadas com exceção de Madagascar e Oceania (3, 31). No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia (31) foram registradas 946 espécies de anfíbios com 913 pertencentes a ordem Anura, um a ordem Caudata e 32 a ordem Gymnophiona. No Brasil, a família Bufonidae é composta por 69 espécies, sendo 35 pertencentes ao gênero *Rhinella* (31).

Nos últimos anos houve uma intensa discussão entre os estudiosos para compreender a imensa diversidade, bem como os aspectos filogenéticos dos anfíbios. No caso específico do gênero *Bufo*, utilizado até recentemente, para maioria das espécies da família Bufonidae em todo mundo, Frost et al. (10), Pramuk (11) e Chaparro, Pramuk e Gluesenkamp (12) levantaram hipóteses da existência de um monofiletismo dentro da família Bufonidae da América do Sul. Assim, para as espécies do gênero *Bufo* sul americanos, estavam disponíveis os gêneros *Chaunus* Wagler, 1828 e *Rhinella* Fitzinger, 1826. Frost et al. (10) propuseram o gênero *Chaunus*, porém com algumas ressalvas no entendimento das relações entre as espécies sul americanas. Posteriormente, Chaparro, Pramuk e Gluesenkamp (12) propuseram o gênero *Rhinella*, proposta aceita atualmente para as espécies dos sapos sul americanos.

## PARASITISMO POR CARRAPATOS EM SAPOS. OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO

Os artrópodes representam uma grande ameaça à saúde pública e dos animais, pois além de causarem diversos efeitos deletérios no organismo do hospedeiro, que vão desde a lesão cutânea, à anemia ocasionada por uma infestação maciça, espoliação em seus hospedeiros, transmitem inúmeros patógenos de caráter enzoótico e zoonótico (1). Dentre os variados grupos dos artrópodes estão os carrapatos, que se alimentam de sangue, linfa e restos teciduais e representam um grupo de grande importância como vetores de doenças infecciosas por utilizarem diversos hospedeiros e possuírem ampla distribuição geográfica (13).

Os carrapatos possuem especificidade variável pelos hospedeiros. Algumas espécies só se alimentam em determinados grupos de hospedeiros, enquanto outras são menos seletivas. Em geral, os estágios imaturos das espécies que realizam ciclos em dois ou mais hospedeiros, alimentam-se em animais de pequeno porte, enquanto adultos tem preferência por animais de médio e grande porte (8).

Em anuros já foram registrados inúmeros agentes patogênicos: bactérias, fungos, protozoários, helmintos e artrópodes. Neste último grupo, encontram-se os carrapatos pertencentes aos gêneros *Amblyomma* e *Ornithodoros*, sendo o primeiro mais comum em associação com estes vertebrados (1, 14, 15).

No Brasil existe apenas um relato do parasitismo por argasídeos, do gênero *Ornithodoros* em anuros da espécie *Thoropa miliaris* (Leptodactylidae), que vivem próximo a cachoeiras, ou seja, áreas muito úmidas e com água corrente, no Estado do Rio de Janeiro (59), sendo este o primeiro registro em toda região neotropical. O segundo relato de uma

espécie de *Ornithodoros* em anuros foi publicado por Rivas et al. (16) os quais registraram o parasitismo em *Rhinella arenarum* da Argentina.

O gênero *Amblyomma* é representado no Brasil por 30 espécies válidas parasitando mamíferos, aves, répteis e anfíbios (17). Contudo, apesar do grande número de espécies de carrapatos descritos, apenas seis foram registradas parasitando anuros do gênero *Rhinella*:, *Amblyomma dissimile* e *Amblyomma rotundatum*, as espécies mais comuns, e *Amblyomma fuscum*, *Amblyomma goeldii*, *Amblyomma humerali* e *Amblyomma cajennense* (1, 18-22). O registro de *A. cajennense* pode ser considerado como totalmente acidental, já que a espécie nunca mais foi assinalada em sapos após a citação de Robinson (23). *A. cajennense*, apesar de sua baixa especificidade, é um carrapato exclusivo de animais de sangue quente como mamíferos e aves, incluindo o homem. Estudos mais amplos e detalhados são necessários para se conhecer com exatidão a importância de anuros como hospedeiros de *Amblyomma fuscum*, *Amblyomma goeldii*, *Amblyomma humerali*.

***Amblyomma dissimile***. É uma espécie muito próxima a *A. rotundatum*, tanto morfológica quanto na distribuição geográfica. Segundo Aragão e Fonseca (24), Jones et al. (25) e Barros-Battesti, Arzu e Bechara (1), *A. dissimile* possui registros parasitando uma gama de hospedeiros heterotérmicos e homeotérmicos, no entanto, a maioria dos registros se concentra em animais de sangue frio, principalmente répteis (1, 22, 26-31). Segundo Guimarães, Tucci e Barros-Battesti (32), a espécie é comum em répteis do Panamá, parasitando mais de 84% dos lagartos e iguanas, 60% dos ofídios e 72% dos sapos. Em anuros esta espécie de carrapatos possui 64 registros naquele país, porém poucos são os registros no Brasil: em *Rhinella* sp. (33) e em *R. marina* (14, 23). Este carrapato possui ampla distribuição sendo encontrado em diversos países das Américas do Norte, Central e do Sul. No Brasil foi encontrado em inúmeros estados como no Acre, Amazonas, Pará, Roraima, Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e São Paulo (1, 14, 22, 34).

***Amblyomma rotundatum***. Como já mencionado, é muito semelhante a espécie anterior. Parasitam especificamente animais de sangue frio e foi descrito pela primeira vez, por Koch em 1844, a partir de uma única fêmea coletada no estado do Pará, Brasil (23). Este carrapato é comum em sapos do gênero *Rhinella* sp. (Fig.1A) e em inúmeras espécies de répteis em condições naturais (22), com alguns relatos em mamíferos (22, 35). Porém, Aragão (33) considera estes eventos como ocasionais, sendo que nenhuma tentativa em alimentar esta espécie de carrapato em laboratório, utilizando animais homeotérmicos como hospedeiros teve sucesso. Reproduz-se por partenogênese, embora haja dois relatos de adultos machos (35, 36). Há um registro de hiperparasitismo, onde uma fêmea não ingurgitada foi registrada fixa no ventre de uma fêmea ingurgitada (37).

A ocorrência de *A. rotundatum* é bastante conhecida para várias espécies de bufonídeos (9, 15, 22, 38, 39). Guglielmone e Nava (22) citam os seguintes hospedeiros: *Anaxyrus terrestris*, *Peltophryne peltoccephala*, *Rhinella* sp., *R. arenarum*, *Rhinella crucifer*, *Rhinella granulosa*, *Rhinella ictérica*, *R. marina*, *Rhinella schneideri*. Em relação às espécies de *Rhinella*, as ocorrências registradas para o Brasil são as seguintes: *Rhinella* sp. (25, 35, 39, 40-42); *R. crucifer* (15); *R. granulosa* (39, 43); *R. schneideri* (15, 21, 43, 44); *R. ictérica* (39, 45-47); *R. marina* (19, 39, 48-52) e *R. jimi* (53). Essas citações resumem-se a simples registros de ocorrência com alguns autores incluindo dados sobre prevalência e intensidade de infestação, porém em amostras reduzidas de hospedeiros. A espécie distribui-se dos Estados Unidos à Argentina (32, 35, 36, 39, 41, 52, 54-56). Nos Estados Unidos esta espécie foi introduzida acidentalmente no sul da Flórida parasitando *R. marina* que foi transportada para esta região no combate às populações de moscas que se formavam nas plantações de cana de açúcar (57). No Brasil, sua distribuição é bastante ampla indo do estado do Amazonas até o Rio Grande do Sul. (1, 18, 19, 32, 33, 40, 48, 54, 55, 58).

## CICLO BIOLÓGICO

As espécies *A. rotundatum* e *A. dissimile* apresentam três estágios no desenvolvimento de seu ciclo biológico, larva, ninfa e adulto, sendo que todos são ativos e dependem do repasto sanguíneo para desempenho pleno de suas funções biológicas. Nas espécies em questão, conhecidos como carrapatos de três hospedeiros, cada estágio tem uma fase de vida livre e uma parasitária (8). Entre os carrapatos, citados na presente revisão, apenas *Ornithodoros* sp. (59) e *A. fuscum* (60) não possuem no momento a descrição de seu ciclo biológico em anfíbios. Dados sobre o ciclo biológico de *A. rotundatum* (9) e *A. dissimile* (14) estão registrados na literatura (Quadro 1). O artigo de Luz et al. (9) é o mais detalhado sobre o ciclo biológico de *A. rotundatum*. (Quadro 1). Em relação a *A. dissimile*, o artigo que apresenta maiores detalhes sobre o ciclo biológico é o de Schumaker e Barros (14), embora partes do ciclo tenham sido publicado por Dunn (61) em *Boa imperator*, *Oxybelis fulgidus*, e *Epicrates cenchria*, Brodtkin (62) em *Iguana iguana* e Freitas et al. (28) em *Tropidurus torquatus*.

**Quadro 1.** Ciclo biológico utilizando sapos como hospedeiros. LUZ et al. (2012) (*A. rotundatum* em *R. Schneideri*) ARAGÃO (1912) (*A. rotundatum* em *Rhinella* sp.), OBA & SHUMAKER (1984) (*A. dissimile* em *R. marina*).

ESTÁGIO	PARAMETROS	LUZ et al. (2012)	ARAGÃO (1912)	OBA & SHUMAKER (1984)
Ovo	Período de Incubação (dias)	25,2 ± 4,2 (18-29)	28-30	59
	Peso médio (massa de ovos)	309,7 ± 58,6 (231,7-383,7)	-	-
	Período de Eclosão (dias)	11,7 ± 1,8 (9-14)	-	-
	Taxa de eclosão dos ovos (%)	66,8 ± 2,3 (65 - 71)	-	-
Larva	Infestação/recuperação (%) Pré-fixação (dias)	300/271(90,3) 2,6 ± 0,7 (2-4)		25
	Ingurgitamento (dias)	17,7 ± 5,4 (11-28)	-	12-47
	Pré-ecdise (dias)	13,8 ± 2,4 (10-19)	-	-
	Período de Ecdise (dias)	2,8 ± 1,8 (1-6)	-	13-35
	Ecdise (%)	191 (70.5)	-	-
Ninfa	Infestação/recuperação (%)	100/87 (87)		
	Pré-fixação (dias)	3,4 ± 0,6 (3-5)	-	6-14
	Ingurgitamento (dias)	21,4 ± 3,9 (13-30)	-	24-32
	Pré-ecdise (dias)	14,1 ± 2,1 (11-18)	-	-
	Período de Ecdise (dias)	6,8 ± 1,9 (5-10)	13-15	31-37
	Ecdise (%)	65 (74.7)	-	-
Adulto	Ingurgitamento (dias)	31,2 ± 4,8 (25-36)	17-22	35
	Peso da fêmea ingurgitada (mg)	639,5 ± 91,8 (530-768)	-	1148-1250
	Período de pré-postura (dias)	4,7 ± 2,2 (3-9)	8-10	8
	Período de Postura (dias)	17,6 ± 1,8 (15-20)	22-26	58
	Eficiência de produção de ovos (%)	48	-	-



## AGENTES INFECCIOSOS

### Agentes infecciosos em anuros

Nas últimas décadas, vários artigos foram publicados sobre agentes infecciosos com o intuito de aprimorar o conhecimento das doenças e das causas de mortalidade em animais silvestres e sua importância para a conservação da fauna, transmissão de agentes patogênicos para os animais de produção e de companhia e as zoonoses.

Os anuros vivem em habitats terrestres e aquáticos, sendo estes expostos a diversos vetores hematófagos. Este comportamento leva estes anfíbios a ocuparem uma posição ideal para serem infectados/parasitados como vírus, riquetsias, protozoários, leveduras e nematóides (63). Entre os hemoparasitos descritos em anuros, já foram relatados protozoários do gênero *Trypanosoma*, e também, do grupo das hemogregarinas *Hepatozoon* (Hepatozoidae) e *Haemogregarina* (Haemogregarinidae) (64).

Inúmeros estudos registram que o parasitismo por *Hepatozoon* é comum em rãs (Ranidae) e sapos (Bufonidae) no mundo todo (65).

Existem diversos grupos de ectoparasitas de anfíbios atuando como vetores de agentes infecciosos: sanguessugas (*Batracobdella picta*) transmitindo tripanossomas, formas observadas em *Rana clamitans*, *R. catesbeiana* e *R. setentrionalis*, *Hyla crucifer*, *R. americanus*, *R. sylvatica* e *Plethodon cinereus* (66). Mosquitos do gênero *Phlebotomus* na transmissão de tripanossomas em rãs na China (67) e o carrapato *A. rotundatum* transmitindo *Hemolivia* e *Hepatozoon* (19, 68).

### Agentes infecciosos em carrapatos associados a anuros

Dentre as espécies de carrapatos, citadas anteriormente parasitando anuros brasileiros, quatro tem registros na literatura como vetor de pelo menos um tipo de agente infeccioso, a espécie *A. rotundatum* é comumente registrada sendo infectada por hemogregarinas. As hemogregarinas são parasitas sanguíneos pertencentes às subordens Adeleina e Eimeriina do filo Apicomplexa, sendo os principais gêneros deste grupo, *Hepatozoon* (Hepatozoidae) e *Haemogregarina* (Haemogregarinidae) (26). Já a espécie *A. dissimile* é provavelmente o vetor de *Hepatozoon fusifex* (69) para *B. constrictor*.

Além dos protozoários, há relatos também da infecção por *Rickettsia belli* em ambos vetores *A. rotundatum* e *A. humerale* (13).

## PATOLOGIA

O aparelho bucal do carrapato penetra profundamente na pele do hospedeiro, permanecendo fixado por meio do hipostômio e pela solidificação da secreção salivar. Ao provocar a laceração dos tecidos e vasos sanguíneos, o carrapato ingere sangue e outros líquidos tissulares dos hospedeiros. No processo de alimentação, os carrapatos causam: ação traumática, ação mecânica, espoliação direta e ação tóxica.

Os carrapatos parasitas de répteis e anuros são conhecidos por produzir lesões na pele (9, 48). Ainda também podem afetar o sistema retículo-endotelial de seus hospedeiros e inocular toxinas (7). Lesões causadas por carrapatos em sapos são citadas em raros trabalhos na literatura. No trabalho de Zug e Zug (70), com *R. marina*, o autor menciona lesões no corpo dos sapos após os carrapatos se desprenderem. Outro trabalho é o de Luz et al. (9) onde relatam intensa irritação na pele dos sapos durante a alimentação de fêmeas adultas de *A. rotundatum* em *R. schneideri*. Mencionam também, que a alimentação de todas as fases (larva, ninfa e adulto) resultou no aparecimento de lesões ulcerativas e hemorrágicas,

especialmente durante a alimentação das fêmeas adultas (Fig. 1B) e que essas lesões foram observadas em 13 (72%) dos 18 sapos naturalmente infestados.



**Fig. 1.** Infestação por *Amblyomma rotundatum* em *Rhinella schneideri*: [A] Fêmeas se alimentando na região ventral e [B] Lesão causada durante a alimentação de uma fêmea na região lateral do corpo. Luz et al. ( 52 ).

As lesões observadas em sapos naturalmente infestados podem levar diretamente para o estabelecimento de doenças infecciosas em hospedeiros debilitados ou permitindo o crescimento de patógenos na área dos ferimentos, podendo interferir na regulação das populações de sapos (9, 65). Altas infestações por carrapatos em anuros podem diminuir a resistência imune desses animais acometidos devido ao estresse podendo leva-los a óbito (44, 48, 49). Contudo, estudos envolvendo a transmissão de agentes patogênicos e os tipos de danos físicos causados pelos carrapatos em sapos são raros no Brasil e precisam ser aprofundados para um melhor conhecimento dessa etapa da relação parasito-hospedeiro.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A despeito do número de publicações sobre o parasitismo de anuros por carrapatos, incluídas nessa revisão, imensas lacunas existem sobre o conhecimento da relação carrapatos e anuros no Brasil. Deste modo estudos sobre a biologia e ecologia mais amplos e detalhados se fazem necessários para podermos quantificar com mais precisão esta associação, principalmente no que concerne a patologia e transmissão de agentes patogênicos.

## REFERÊNCIAS

1. Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD/Butantan; 2006.
2. Gomes LDH. Avaliação dos fatores causadores do declínio populacional de anfíbios, com ênfase na doença quitridiomíose [monografia]. Juiz de Fora: Centro de Ensino Superior; 2006.
3. AmphibiaWeb. Information on amphibian biology and conservation [Internet]. Berkeley, California; 2012 [cited 2012 Nov 8]. Available from: <http://amphibiaweb.org/>
4. Labruna MB. Carrapatos. Hora Vet. 2004;137:63-5.

5. Silvano DL, Segalla MV. Conservação de anfíbios no Brasil. Curitiba: Megadiversidade; 2005.
6. Barros DM, Baggio D. Ectoparasites Ixodida Leach, 1817 on wild animals in the state of Paraná, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87:291-6.
7. Jakowska S. Lesions produced by ticks, *Amblyomma dissimile*, in *Bufo marinus* toads from the Dominican Republic. Am Zool. 1972;12:731.
8. Faccini JH, Barros-Battesti D. Aspectos gerais da biologia e identificação de carrapatos. In: Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD/Butantan; 2006.
9. Luz HR, Faccini JH, Pires MS, Da Silva HR, Barros-Battesti DM. Life cycle and behavior of *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions and remarks on parasitism of toads in Brazil. Exp Appl Acarol. 2012 Oct 26. doi: 10.1007/s10493-012-9628-8.
10. Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Hass A, Haddad CFB, et al. The amphibian tree of life. Bull Am Mus Nat Hist. 2006;297:1-370.
11. Pramuk JB. Phylogeny of south American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. Zool J Linn Soc. 2006;146:407-52.
12. Chaparro JC, Pramuk JB, Gluesenkamp AG. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru. Herpetologica. 2007;63:203-12.
13. Labruna MB, Salim MV, Nava S, Bermudez S, Venzal JM, Dolz G, et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. Rev MVZ Córdoba. 2011;16:2435-57.
14. Schumaker TTS, Barros DM. Notes on the biology of *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 (Acari: Ixodida) on *Bufo marinus* (Linnaeus, 1758) from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994;89:29-31.
15. Luz HR, Faccini JLH. Parasitismo de *Amblyomma rotundatum* em *Rhinella schneideri* na Estação Ecológica de Piratininga, Minas Gerais. In: Anais do 16º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária; 2010, Campo Grande. Campo Grande-MS: CBPV; 2010.
16. Rivas CJG, Castillo GN, Acosta JC, Venzal JM, Guglielmone AA. Primer reporte de parasitismo de una garrapata blanda del género *Ornithodoros* (Ixodida: Argasidae) sobre *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) en el departamento de Valle Fértil, San Juan, Argentina. Cuad Herpetol. 2012;26:95-7.
17. Dantas-Torres F, Onofrio VC, Barros-Battesti DM. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. Syst Appl Acarol. 2009;14:30-46.
18. Wells EA, D'Alessandro A, Morales GA, Angel D. Mammalian wildlife diseases as hazards to man and livestock in an area of the Llanos Orientales of Colombia. J Wildl Dis. 1981;17:153-62.

19. Petit G, Landau I, Baccam D, Lainson R. Description et cycle biologique d'*Hemolivia stellata*, n.g.,n.sp., hemogrégarine de Crapauds brésiliens. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990;65:3-15.
20. Brum JGW, Costa PRP. Confirmação da ocorrência da *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) no Rio Grande do Sul. *Arq Inst Biol.* 2003;70:105-6.
21. Szabó MPJ, Olegário MMM, Santos ALQ. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. *Exp Appl Acarol.* 2007;43:73-84.
22. Guglielmone AA, Nava S. Hosts of *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Zootaxa.* 2010;2541:27-49.
23. Robinson LE. Ticks. A monograph of the Ixodoidea. Part IV. The genus *Amblyomma*. London: Cambridge University Press; 1926.
24. Aragão HB, Fonseca F. Notas de ixodologia: VIII. Lista e chaves para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1961;59:115-30.
25. Jones EK, Clifford CM, Keirans JE, Kohls GM. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western Hemisphere. *Brigham Young Univ Sci Bull Biol Ser.* 1972;17:1-40.
26. Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozool.* 1980;27:37-58.
27. Brum JGW, Rickes EM. *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) em serpente sucuri (*Eunectes murinus*) (Reptilia: Boidae) no Parque Zoológico do Rio Grande do Sul. *Arq Inst Biol.* 2003;70:215-6.
28. Freitas LHT, Faccini JLH, Daemon E, Prata MCA, Barros-Battesti DM. Experimental infestation with the immatures of *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) on *Tropidurus torquatus* (Lacertilia: Iguanidae) and *Oryctolagus cuniculus*. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2004;56:126-9.
29. Dantas-Torres FE, Oliveira-Filho F, Soares FA, Souza BOF, Valença RBP, Sá FB. Ticks infesting Amphibians and Reptiles in Pernambuco, Northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2008;17:218-21.
30. Carrascal J, Oviedo T, Monsalve S, Torres A. *Amblyomma dissimile* (Acari: Ixodidae) parásito de *Boa constrictor* en Colombia. *Rev MVZ Córdoba.* 2009;14:1745-9.
31. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Lista de espécies de anfíbios do Brasil [Internet]. 2012 [acesso em 2012 Nov 08]. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfíbios.htm>
32. Guimarães JH, Tucci EC, Barros-Battesti DM. Ectoparasitos de importância veterinária. São Paulo: Plêiade/FAPESP; 2001.
33. Aragão HB. Contribuição para a sistemática e biologia dos ixódidas. Partenojenez em carrapatos. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1912;4:96-119.

34. Onofrio VC. Revisão do gênero *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) no Brasil [tese]. Rio de Janeiro: Seropédica, Universidade Federal Rural; 2007.
35. Labruna MB, Terrassini FA, Camargo LMA. First report of the male of *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae) from a field-collected host. *J Med Entomol.* 2005;42:945-7.
36. Keirans JE, Oliver JH. First description of the male and redescription of the immature stages of *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae), a recently discovered tick in the U.S.A. *J Parasitol.* 1993;79:860-5.
37. Labruna MB, Ahid SMM, Soares HS, Suassuna ACD. Hyperparasitism in *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae). *J Parasitol.* 2007;93:1531-2.
38. Faccini JLH, Martha QLL, Daemon E. Biologia da fase não parasitária de *Amblyomma rotundatum* (Koch, 1844) (Acari: Ixodiade) alimentados em *Bufo ictericus*. In: Anais do 11º Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária; 1999, Salvador. Salvador: Universidade Estadual de Santa Cruz; 1999. p.91.
39. Onofrio VC, Duarte MR, Labruna MB, Barros-Battesti DM. Regiões brasileiras de ocorrência de *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). Anais do 12º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária; 2002, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: CBPV; 2002. p.2.
40. Labruna MB, Leite RCL, Oliveira, PR. Study of the weight of eggs from six ixodid species from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92:205-7.
41. Barbieri FS, Chacón SC, Labruna MB, Barros-Battesti DM, Faccini JLH, Famadas KM. Topographical and numerical study of the idiosomal integumentary structures of the larva of four Neotropical species of *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol.* 2000;68:57-70.
42. Labruna MB, Whitworth T, Bouyer DH, McBride J, Camargo LMA, Camargo EP, et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondonia, western Amazon, Brazil. *J Med Entomol.* 2004;41:1073-81.
43. Santos ED, Botelho MCN, Oliveira JB. Ectoparasitos de anfíbios anuros (Anura: Bufonidae) capturados na estação ecológica do Tapacura, São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brasil. *Entomol Vectores.* 2002;9:105-13.
44. Antonucci AM, Marcantonio AS, França FM, Pereira JR. Ocorrência de *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) em *Bufo ictericus* Spix, 1824 (Anura: Bufonidae) no Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil. *Natureza Online.* 2012;10:5-6.
45. Woehl JRG. Infestação de *Amblyomma rotundatum* (Koch) (Acari, Ixodidae) em sapos *Bufo ictericus* (Spix) (Amphibia, Bufonidae): novo registro de hospedeiro. *Rev Bras Zool.* 2002;19:329-33.
46. Fonseca CR, Becker CG, Haddad CFB, Prado PI. Metamorfose: o declínio mundial dos anfíbios é agravado pela desconexão entre o hábitat aquático dos girinos e o hábitat terrestre dos adultos, induzida pelas atividades humanas. *Sci Am Bras.* 2008;72:88-93.

47. Luque JL, Martins NA, Tavares LER. Community structure of metazoan parasites of the yellow cururu toad, *Bufo ictericus* (Anura, Bufonidae) from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Parasitol.* 2005;50:215-20.
48. Aragão HB. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1936;31:759-843.
49. Oba MSP, Schumaker TTS. Estudo da biologia de *Amblyomma rotundatum* (Koch, 1844), em infestações experimentais de *Bufo marinus* (L., 1758) sob condições variadas de umidade relativa e de temperatura do ar. *Mem Inst Butantan.* 1983-1984;47-48:195-204.
50. Lampo M, Rangel Y, Mata A. Genetic markers for the identification of two tick species, *Amblyomma dissimile* and *Amblyomma rotundatum*. *J Parasitol.* 1997;83:382-6.
51. Figueiredo LTM, Badra SJ, Pereira LE, Szabó MPJ. Report on ticks collected in the Southeast and MidWest regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32:613-9.
52. Ahid SMM, Fonseca ZAAS, Ferreira CGT, Martins TF, Oliveira MF. Parasitismo de *Amblyomma rotundatum* (Koch) (Acari: Ixodidae) em *Bufo marinus* (Linnaeus) (Anura: Bufonidae), em Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. *Rev Bras Zoocienc.* 2009; 11:153-6.
53. Dantas-Torres F, Ferreira DRA, Melo LM, Lima PACP, Siqueira DB, Albuquerque LCR, et al. Ticks on captive and free-living wild animals in northeastern Brazil. *Exp Appl Acarol.* 2010;50:181-9.
54. Evans DE, Martins JR, Guglielmone AA. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution – 1 – The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95:453-70.
55. Arzua M, Onofrio VC, Barros-Battesti DM. Catalogue of the tick collection (Acari: Ixodida) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. *Rev Bras Zool.* 2005;22:623-32.
56. Paredes-León R, García-Prieto L, Guzmán-Cornejo C, León-Regagnon V, Pérez TM. Metazoan parasites of Mexican amphibians and reptiles. *Zootaxa.* 2008;1904:1-166.
57. Oliver JH, Hayes MP, Keirans JE, Lavender DR. Establishment of the foreign parthenogenetic tick *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae) in Florida. *J Parasitol.* 1993;79:786-90.
58. Guerra RMSNC, Silva ALA, Freire NMS. *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) in *Kinosternon scorpioides* L. (Chelonia: Kinosternidae) in Maranhão state, Brazil. *Entomol Vectores.* 2000;7:335-8.
59. Barros-Battesti DM, Luz HR, Ouvemay D, Albuquerque GLC, Landulfo GA, Santos Sampaio J, et al. Description of *Ornithodoros* sp.n. (Acari: Argasidae) found in Brazil on

- a new host class. In: Seventh Ticks and Tick-borne Pathogens International Conference; 2011, Zaragoza. Zaragoza, Spain: TTP7; 2011. p.57.
60. Martins TF, Soares JF, Sampaio JS, Soares HS, Kubo AH, Barros-Battesti DM, et al. Biology of *Amblyomma fuscum* (Acari: Ixodidae) in the laboratory. In: Symposia of the 13<sup>o</sup> International Congress of Acarology; Recife. Recife-PE: ICA; 2010. p.146-7.
  61. Dunn LH. Studies on the iguana tick *Amblyomma dissimile*, in Panama. *J Parasitol.* 1918;5:1-10.
  62. Brodtkin GE. The biology of *Amblyomma dissimile* Koch, with an account of its power of reproducing parthenogenetically. *Parasitology.* 1918;11:10-7.
  63. Desser SS. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. *J Parasitol.* 2001;87:152-60.
  64. Souza MA, Borriello Filho A. Uma nova hemogregrina no sangue de *Bufo crucifer* WIED, 1821 do Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1974;72:275-82.
  65. Smith TG. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *J Parasitol.* 1996;82:565-85.
  66. Barta JR, Desser SS. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. *J Wildl Dis.* 1984;20:180-9.
  67. Feng LS, Chao CS. The development of *Trypanosoma bocagei* in *Phlebotomus squamirostris*. *Chin Med J.* 1943;62:210-7.
  68. Lainson R, Souza MC, Franco CM. Natural and experimental infection of the lizard *Ameiva ameiva* with *Hemolivia stellata* (Adeleina: Haemogregarinidae) on the toad *Bufo marinus*. *Parasite.* 2007;14:323-8.
  69. Ball GH, Chao J, Telford Jr SR. *Hepatozoon fusifex* sp. n., hemogregarine from *Boa constrictor* producing marked morphological changes in infected erythrocytes. *J Parasitol.* 1969;55:800-13.
  70. Zug GR, Zug P. The marine toad, *Bufo marinus*. A natural history resume of native populations. Washington: Smithsonian Institution Press; 1979.

**Recebido em: 19/12/12**

**Aceito em: 04/03/13**

## TRAUMA CRANIOENCEFÁLICO EM PEQUENOS ANIMAIS

Emerson Gonçalves Martins Siqueira<sup>1</sup>  
Sheila Canevese Rahal<sup>2</sup>  
Flávia Gardilin Vassalo<sup>3</sup>  
Fábio André Pinheiro de Araújo<sup>4</sup>  
Felipe Stefan Agostinho<sup>5</sup>

### RESUMO

Devido à importância do trauma cranioencefálico (TCE) em pequenos animais, o presente trabalho teve por objetivos discorrer sobre a fisiopatologia da afecção, os procedimentos terapêuticos pré-hospitalares e hospitalares, além de considerações relacionadas aos cuidados no transporte e manejo inicial do paciente imediatamente após o trauma. O profissional deve identificar o TCE pré-hospitalar e tratar o paciente como um indivíduo politraumatizado, incluindo os cuidados com a imobilização. Na terapia hospitalar os procedimentos de craniotomia são importantes, sobretudo para retirada de coágulos. Além disso, o uso de glicocorticóides precisa ser evitado devido aos efeitos secundários. Por outro lado, associações terapêuticas como a do manitol com a furosemida aumentam as perspectivas de sucesso.

**Palavras-chave:** trauma cranioencefálico, politraumatismo, imobilização, cães, gatos

## TRAUMATIC BRAIN INJURY IN SMALL ANIMALS

### ABSTRACT

Due to the importance of traumatic brain injury (TBI) in small animals, the aim of this review was to discuss the pathophysiology of the disease, the pre-hospital and hospital therapeutic procedures, as well as considerations related to transport and initial care of the patient immediately after trauma. The professional must identify the pre-hospital TBI and treat the victim as a polytraumatized patient, including immobilization. In hospital therapy the procedures of craniotomy are important, especially to remove blood clots. In addition, the use of glucocorticoids must be avoided because of side effects, but combination therapies such as mannitol with furosemide increase the probability of success.

**Keywords:** head trauma, brain trauma, multiple trauma, immobilization, dogs, cats

## LESIÓN CEREBRAL TRAUMÁTICA EN PEQUEÑAS ESPECIES

### RESUMEN

Dada la importancia de los traumas craneoencefálicos (tce) en pequeñas especies, este estudio tuvo como objetivo discutir la fisiopatología de dicha afección, los procedimientos terapéuticos prehospitales y hospitalarios y las consideraciones relacionadas con el

<sup>1</sup> Médico Veterinário Residente - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ UNESP

<sup>2</sup> Prof. Titular do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

<sup>3</sup> Médica Veterinária Residente - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ UNESP

<sup>4</sup> Doutorando em Medicina Veterinária - FMVZ UNESP - Botucatu

<sup>5</sup> Mestrando em Medicina Veterinária - FMVZ UNESP - Botucatu



transporte y el cuidado en el abordaje inicial del paciente inmediatamente después del trauma. El médico debe identificar el tce y tratar al paciente como un individuo politraumatizado, incluyendo la inmovilización. En la terapia nosocomial es importante la craneotomía, especialmente para la eliminación de coágulos. Además, se debe evitar el uso de glucocorticoides debido a sus efectos secundarios. Por otro lado, la asociación terapéutica de manitol con furosemida aumenta la probabilidad de éxito.

**Palabras clave:** trauma cerebral, trauma múltiple, inmovilización, perros, gatos

## INTRODUÇÃO

O traumatismo craniano grave (TCE) geralmente resulta em isquemia cerebral, hipóxia, edema e hemorragia. Esta última pode ser intracraniana, extracraniana, subdural, subaracnoidea ou intraparenquimatosa (1). O paciente veterinário, independente da espécie, é altamente susceptível a processos traumáticos. Como descrito por Bagatini (2), na cidade de Brasília, de 170 animais atropelados 17% correspondiam a espécies domésticas, sendo o índice de animais atropelados de 0,08 por quilômetro percorrido. Além de atropelamentos, o TCE pode ser decorrente de quedas, lesões por esmagamento ou por arma de fogo, ataques de outros animais e maus tratos (3). Ressalta-se ainda que os cães e gatos possuem uma estrutura corpórea reduzida e uma superfície de contato grande em relação ao impacto, de forma que o paciente com TCE, na maioria das vezes, é também um indivíduo politraumatizado (2, 3).

Devido à importância do TCE em pequenos animais, o presente trabalho teve por objetivos discorrer sobre a fisiopatologia da afecção, os procedimentos terapêuticos pré-hospitalares e hospitalares, além de considerações com respeito aos cuidados no transporte e manejo inicial do paciente imediatamente após o trauma.

## Fisiopatologia do TCE

A fisiopatologia do TCE baseia-se na lesão cerebral primária, imediata ao evento, e na lesão cerebral secundária, que é tardia e mais importante (3-5). Oito em dez lesões parenquimatosas diretas associadas com a injúria cerebral primária estão fora do controle clínico (4). Assim, o foco deve ser na prevenção, reconhecimento e tratamento da lesão cerebral secundária (4-6).

As alterações cerebrais primárias são graduadas de acordo com a gravidade e classificadas em concussão, contusão, laceração e lesão axonal difusa (3, 4). A lesão vascular direta também ocorre levando à hemorragia intracraniana e edema vasogênico (3-5). A concussão é uma lesão cerebral leve, que promove perda transitória de consciência, sem alterações macro ou microscópicas (1, 3, 6). A contusão é uma alteração de moderada a severa, que causa laceração no parênquima cerebral e/ou na vascularização, podendo haver hemorragia parenquimatosa ou edema (1, 4, 6). Os distúrbios e sinais clínicos variam com a gravidade do caso (3). Como é um processo gerado por impacto, há duas áreas importantes: a do golpe (sítio de impacto) e a do contragolpe (contrária à área de impacto), que resulta no deslocamento do cérebro no crânio (3, 4). Na contusão são observadas áreas cicatriciais (4). A laceração constitui-se na mais grave lesão cerebral primária (3, 4). Assim como a contusão, pode haver hemorragia em parênquima cerebral e edema, porém ocorre devido a fraturas de crânio e feridas penetrantes (1, 3). As sequelas são comuns, podendo se desenvolver horas ou dias após o trauma, e ocorrem pela liberação de mediadores inflamatórios, lesão axonal e hemorragia contínua (3, 4, 7).

As principais consequências da lesão secundária são hemorragia, aumento da pressão intracraniana (PIC) por edema e comprometimento da barreira hemato encefálica, e alteração na reatividade vascular cerebral (3, 4). A lesão secundária é mediada pelo aumento da

atividade de neurotransmissores excitatórios gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) e produção de citocinas pró-inflamatórias, que podem contribuir para a morte celular (4, 7). Com a liberação dos neurotransmissores excitatórios, como o glutamato e a intensa atividade metabólica, ocorre depleção de ATP (3, 4, 8). Essa falha energética leva a perturbação na homeostase iônica e fluxo descontrolado de sódio e cálcio para os neurônios, promovendo edema citotóxico e despolarização (3, 9, 10). O edema cerebral pode também ser causado por acúmulo de cloreto e água e todos os fatores levarão ao escape de líquido para o espaço extracelular (3, 8). O acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior das células ativa enzimas intracelulares, que causam graves danos e levam à morte celular (4). Além do edema citotóxico, há também o edema vasogênico por trauma mecânico primário, ou secundário a processos autolíticos como reação com radicais livres, cascata do ácido araquidônico, cascatas de coagulação, entre outros (3-9). Esses fatores levam a um aumento da permeabilidade vascular endotelial, que acarretará no extravasamento de filtrado rico em proteína, característico do edema vasogênico (1, 3, 4, 8, 9).

### Controle da pressão intracraniana (PIC)

Para que haja a pressão de perfusão cerebral (PPC), e assim fornecer oxigênio e nutrientes essenciais ao parênquima, é necessário o equilíbrio entre a pressão arterial média (PAM) e a pressão intracraniana (PIC) (4, 5, 9).

$$PPC = PAM - PIC.$$

Um paciente que sofreu TCE e possui queda da pressão arterial tem como consequência a diminuição da PPC por auto-regulação (3-5,10-13). Esta última mantém a PIC entre 8 e 15 mmHg (4). Se a PIC aumentar além dos limites dos mecanismos compensatórios de perfusão cerebral há comprometimento e isquemia do tecido cerebral e desencadeia-se o reflexo de Cushing (resposta cerebral isquêmica levando à bradicardia reflexa) (4, 12, 13). Com a isquemia há diminuição do fluxo sanguíneo cerebral, aumentando o nível de  $\text{CO}_2$  que é percebido pelo centro de controle vasomotor no local (3, 4, 13). Este inicia uma resposta do sistema nervoso simpático que leva ao aumento PAM a fim de aumentar a PPC (5, 7). A hipertensão sistêmica é detectada pelos barorreceptores das artérias carótidas e do arco aórtico e resulta em bradicardia reflexa (3, 9, 13). A resposta isquêmica ocorre tardiamente, o que indica elevação do risco de vida no aumento da PIC (5, 11, 13).

As alterações sistêmicas à lesão cerebral secundária são hipotensão, hipóxia, hipo ou hiperglicemia, hipo ou hipercapnia e hipertermia (1, 3, 4, 12). As ações sistêmicas podem resultar em lesão de órgãos pela vasoconstrição intensa, isquemia de miocárdio e arritmias ventriculares devido à liberação de catecolaminas (3, 7). Esses efeitos pioram a lesão cerebral, como resultado do comprometimento da perfusão cerebral (3, 14). Além disso, Verneau (4) afirmaram que o aumento da pressão intracraniana pode causar deslocamentos ou hérnias cerebrais. Se for ventral à foice cerebral pode ocorrer herniação de foice, se for ventral ao *tentorium* ter-se-á hérnia de *uncus*, se pelo forame magno haverá herniação tonsilar.

### Intervenção pré-hospitalar

Segundo o Ministério da Saúde (15), atendimento pré-hospitalar é “o atendimento que procura chegar precocemente à vítima, após ter ocorrido um agravo à sua saúde (de natureza traumática ou não traumática ou ainda psiquiátrica), que possa levar ao sofrimento ou mesmo à morte, sendo necessário, portanto, prestar-lhe atendimento em serviço de saúde devidamente hierarquizado e integrado ao Sistema Único de Saúde”, conhecido por SUS. Embora a medicina veterinária não possua um SUS, os conceitos são aplicáveis. Assim, o atendimento

pré-hospitalar não se trata de um tratamento definitivo e sim uma forma de manter a homeostase até que haja possibilidade do tratamento adequado (16, 17).

Conforme Spilzman (18), o TCE é a causa mais importante de morte nos traumas, sendo que o traumatismo raquimedular ocorre em 5 a 10% dos casos. O paciente traumatizado pode apresentar-se com sonolência, confusão, agitação ou inconsciência de curta ou longa duração (4, 17, 18). O exame primário baseia-se na avaliação das vias aéreas, respiração e estado circulatório, que consiste no “ABC” da emergência (4, 12, 18). É importante obter o histórico, o tempo e a progressão dos sinais neurológicos, assim como efetuar cuidados com a coluna cervical, que requer estabilização (4, 18). Visto o número elevado de animais errantes em nosso meio, o histórico é frequentemente incompleto, particularmente em gatos, fator que muitas vezes dificulta a determinação da causa da lesão e o tempo da ocorrência.

As hemorragias precisam ser controladas e deve-se avaliar constantemente a consciência (4, 12, 18, 19). A presença de hemorragia nasal, nas orelhas, na região da nasofaringe, órbita e nos seios frontais frequentemente indicam fratura no crânio (4, 12, 18). Os exsudatos não hemorrágicos também requerem análise, visto que concentrações de glicose cerca de 80% nestes exsudatos sugerem perda de fluido cérebro espinal (4). O local de saída do fluido fornece uma porta de entrada de bactérias para o cérebro, além da possibilidade de desenvolvimento de uma fístula liquórica crônica (3, 4). Nos casos em que houver êmese, o paciente precisa ser movimentado em bloco, de modo a evitar a aspiração, com imobilização da coluna cervical com colar, porém sem vasoconstringir a veia jugular (4, 20). A cabeça necessita ser mantida em ângulo de 30°, para maximizar o suprimento arterial e para drenagem venosa do cérebro (4). É importante o exame de fundo de olho, que pode indicar papiledema (edema de papila óptica por aumento da PIC) (4, 12, 16, 18, 19). O nível de consciência necessita avaliação tanto na intervenção pré-hospitalar quanto na hospitalar. Na presente revisão foi adotada a Escala de coma de Glasgow pediátrica modificada para cães, segundo Andrade et al. (19) (Tabela 1).

Os métodos precários de transporte podem agravar as lesões existentes (18, 20). Além da equipe qualificada, também são importantes os equipamentos adequados para o transporte (20, 21). Estes podem ser maca, ou padiola, e prancha longa (indicada para pacientes politraumatizados), sendo que há possibilidades de improvisação (18, 20, 21). A prancha longa pode ser feita com porta, prancha de “surf” ou uma tábua longa e resistente (20). A maca ou padiola, por sua vez, é passível de construção com cabos de vassoura presos a cobertores, paletós, camisas, cordas, lonas ou sacos de pano (20, 21). O método de transporte terrestre apropriado é por ambulância, porém na ausência desta transportar o paciente em veículos grandes como caminhonetes (20, 21). Para os autores da presente revisão esses cuidados são um dos grandes desafios da Medicina Veterinária em nosso país e requerem medidas de conscientização da população. Por não existir equipes de resgate especializadas, o transporte é efetuado pelo proprietário, que desconhece as condutas necessárias.

Tanto na intervenção pré-hospitalar quanto hospitalar é importante a localização do local da lesão pelos sinais clínicos (18, 20-23) e pode ser feita do seguinte modo:

A) Síndrome cerebral: Animal com alteração mental e comportamental, pode apresentar déficits proprioceptivos contrários a lesão, cegueira com reflexo pupilar normal (amaurose), papiledema e respiração em Cheyne-Stokes. A descerebração, dá-se por acometimento do cérebro rostral e mesencéfalo, sendo característica se houver opistótono com alteração mental, podendo haver espasticidade nos quatro membros (1, 4, 24-27).

Tabela 1. Escala de coma de Glasgow pediátrica modificada para cães

<b>Indicador</b>	<b>Critério/resposta</b>	<b>Escore</b>
Abertura ocular	Espontânea	4
	Estímulo verbal/comando	3
	Estímulo verbal/comando/ao grito	3
	Estímulo doloroso	2
	Sem abertura	1
Melhor resposta à vocalização	Latido/rosnado	5
	Choramingo irritado	4
	Choramingo à dor	3
	Ganido à dor	2
	Sem resposta	1
Melhor resposta motora	Movimento espontâneo e normal	6
	Reação ao toque	5
	Reação à dor	4
	Flexão anormal – descorticação	3
	Extensão anormal – descerebração	2
	Nenhuma	1
<b>Total</b>		<b>15</b>

Escore mínimo é 3, indica não reação, e o máximo é 15, indica que o doente está desperto, alerta e totalmente responsivo. Classificação associada à gravidade: alteração grave o intervalo entre 3-8, moderada entre 9-12, leve entre 13-14 e normal 15. A queda de três escores na escala considera-se como sinal de alerta, pois o paciente pode estar mudando de faixa na classificação de gravidade (19).

B) Síndrome diencefálica: As alterações são semelhantes à síndrome cerebral. No entanto, são também observadas anormalidades no apetite, na ingestão de água, na regulação de temperatura e distúrbios endócrinos como diabetes insípido (22, 23, 25, 27).

C) Síndrome mesencefálica: Estado mental alterado, déficit do nervo III (estrabismo lateral, midríase, reflexo pupilar ausente), opistótono. Reflexos e tônus aumentados, e déficits posturais nos quatro membros (16, 22, 26, 27).

D) Síndrome ponto-bulbar: estado mental alterado, déficit do 5º par de nervos cranianos (paralisia mandibular e diminuição da sensibilidade na face), diminuição do reflexo palpebral (nervos V e VII), paralisia facial (nervo VII), desvio de cabeça, quedas, andar em círculos, nistagmo, paralisia de faringe e laringe (nervos IX e X), e paralisia de língua (nervo XII) (23, 25).

E) Síndrome vestibular: estado mental deprimido, desequilíbrio e queda, desvio de cabeça, andar em círculos, nistagmo, estrabismo ventrolateral, déficit dos nervos V, VI e VII e síndrome de Horner (ptose palpebral superior, miose, protrusão de 3ª pálpebra). É importante distinguir a lesão vestibular central e periférica (Tabela 2) (1, 23, 24).

Tabela 2. Lesão vestibular Central (LVC) x Periférica (LVP) pelos sinais clínicos

<b>Sinais clínicos</b>	<b>LVC</b>	<b>LVP</b>
<b>Nistagmo Espontâneo</b>	Horizontal, rotatório, vertical	Horizontal, rotatório
<b>Nistagmo posicional</b>	Modifica	Constante
<b>Déficits de nervos cranianos</b>	V, VI, VII, IX	VII
<b>Síndrome de Horner</b>	Ausente	Presente
<b>Paresia e déficits posturais</b>	Presentes	Ausentes
<b>Estado mental</b>	Alterado	Normal

F) Síndrome cerebelar: tremores intencionais de cabeça, nistagmo, anisocoria (uma pupila dilatada e a outra contraída), base de apoio aberta, hipertermia, reações posturais

retardadas ou exageradas, opistótono e ausência de reflexo de ameaça com a visão normal. Uma lesão cerebelar que pode ser confundida com a descerebração é a descerebelação. Esta se caracteriza por opistótono sem alteração mental. Os membros torácicos estarão espásticos e os pélvicos flácidos e flexionados (4, 22, 24-27).

### **Intervenção hospitalar**

Nesse momento é fundamental observar o quadro clínico do animal, o nível de consciência e os reflexos do tronco cerebral. Separar aqueles reflexos intrínsecos mediados pelo tronco cerebral, reflexos pupilares em resposta à luz, posição ocular (em repouso), movimentos oculocefálicos (1, 4, 16, 19, 24). Além disso, é preciso realizar métodos de exames complementares, para correto diagnóstico, e as terapias médicas e cirúrgicas específicas (1, 4, 12, 18, 28).

### **Diagnóstico**

O diagnóstico baseia-se no histórico do trauma, com a localização da disfunção no cérebro (4, 24, 26, 28). Os pacientes com TCE são submetidos a exames neurológicos cuidadosos e repetidos, para determinar a localização da lesão, a gravidade e a evolução (4, 12, 28, 29). Como a maioria dos pacientes com TCE tem lesões do sistema respiratório, é necessária uma auscultação cuidadosa (4, 12). Cães com trauma torácico significativo requerem avaliações frequentes para identificação de arritmias cardíacas de início tardio, causadas por contusão do miocárdio, e dispnéia por hemorragia pleural e/ou pulmonar tardia (4, 12). Também realizar exame físico com o intuito de buscar lesões esqueléticas associadas (1, 4). Uma conduta comum efetuada pelos autores da atual revisão é a punção abdominal, torácica, ou de ambas as cavidades, o que muitas vezes auxilia na identificação precoce de lesões concomitantes ao TCE. São importantes métodos de auxílio diagnóstico a radiografia, a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM) (1, 5, 12, 24).

Radiografias torácicas de animais com traumatismo craniano são necessárias para identificação de hemorragia, contusão pulmonar e pneumotórax (4, 11). A radiografia de crânio pode ajudar a avaliar o paciente com suspeita de fratura craniana (1). Embora as linhas de fraturas e fragmentos ósseos possam ser visibilizados por radiografias do crânio, modalidades de imagem mais avançadas como a TC e RM permitem a identificação de hemorragias, lesões de massa e edema cerebral (1, 4, 12). Naqueles animais em que a afecção medular não pode ser descartada (1, 12), é importante incluir radiografias da coluna vertebral. Animais com TCE devem ter análises hematológicas e bioquímicas (enzimas hepáticas podem estar aumentadas na contusão) de rotina (1, 24). Outros exames a serem efetuados são hemogasometria, eletrólitos séricos e osmolaridade sérica. O exame do líquido é contra-indicado (1, 4).

### **Terapia e prognóstico**

O manejo de pacientes com TCE necessita de atenção quanto ao volume sanguíneo cerebral e fluxo sanguíneo cerebral (4). A maior parte dos fatores que os alteram são: PaCO<sub>2</sub>, a hipercapnia promove vasodilatação e aumento da PIC (4, 12, 29). Por outro lado, a vasoconstrição pode causar diminuição do volume sanguíneo cerebral e, assim, isquemia cerebral (4, 29). Quanto à PAM, sua autorregulação pode ser perdida nas áreas cerebrais traumatizadas, isquêmicas e com aumento da PIC (4, 29). O reflexo de Cushing ocorre em resposta ao aumento da PIC levando ao aumento na PAM para manter adequada perfusão cerebral (3, 4, 12, 29). Há vasodilatação cerebral em resposta à diminuição da PaO<sub>2</sub> para manter adequada oxigenação cerebral (4, 29). Nas áreas traumatizadas do cérebro essa

resposta pode ser perdida e ocorre diminuição da oxigenação, acarretando em isquemia cerebral (3, 4, 29). O aumento da taxa metabólica cerebral causa aumento do fluxo sanguíneo cerebral e, assim como a inalação de anestésicos, também eleva a PIC (4, 29). Barbitúricos diminuem a taxa metabólica cerebral e, deste modo, diminuem a PIC. No entanto, seu uso pode causar hipotensão sistêmica e hipoventilação, que podem exacerbar a elevação da PIC (3, 4, 29).

A terapia pode ser dividida em terapia de suporte, para tratar os problemas que levem risco à vida, além de prevenir as injúrias secundárias, e terapia médica específica (1, 4, 5, 12, 29). No transcorrer terapêutico são mantidos os mesmos cuidados quanto às fraturas e instabilidades vertebrais (4, 12, 29). Quanto à terapia de suporte, precisam ser avaliados periodicamente parâmetros como temperatura, vias aéreas livres, oxigenação do paciente e situação do sistema cardiovascular, além de efetuar fluidoterapia e controlar a pressão arterial (4, 12, 20). A temperatura corpórea pode ser usada para estimar a temperatura cerebral e, se houver hipertermia, indica pior evolução neurológica (4, 5, 29). A baixa perfusão cerebral de oxigênio é uma das causas mais importantes de lesão cerebral (5, 12). O paciente com TCE por desidratação estará hipovolêmico, o que leva à diminuição da PAM e aumento da PIC sendo, portanto, necessária a restauração da volemia (4, 12).

Platt (12) defende o uso de coloides e solução salina hipertônica já na terapia inicial, por causa da rápida restauração da euvolemia por desidratação. É contrário ao uso de cristaloides isotônicos, uma vez que extravasarão para o interstício após uma hora de administração. Há necessidade de grande quantidade de fluido para reposição da euvolemia e, conseqüentemente, exacerba-se o edema craniano. Verneau (4) indica o uso de cristaloides isotônicos para reposição da diurese imposta por outros fármacos, como o manitol, e pela desidratação, por salina hipertônica, que são utilizados no tratamento do TCE. As doses indicadas para cristaloides são de no máximo 90 mL/kg/h para os cães e 40 a 60 ml/kg/h para os gatos (4, 12).

A solução salina hipertônica administrada em dose de 4-5 mL/kg, por 3 a 5 minutos, drena o fluido do interstício e intracelular para o espaço intravascular, o que promove aumento da pressão sanguínea, eleva a PPC e, conseqüentemente, diminui a PIC (4,5,12,13). Entretanto, é preciso evitar a presença de desidratação sistêmica ou hipernatremia, que podem ser observados em até uma hora (5, 6, 12, 13,). Os coloides, como Dextra-70 ou Hetastarch, são úteis em pacientes com albumina baixa, hemorragia ou inflamação sistêmica e devem ser administrados após o uso da solução salina para manter o volume intravascular, sendo assim úteis na redução do edema cerebral (4, 6, 12, 13). A co-administração de solução salina hipertônica e coloide é mais efetiva na restauração da euvolemia do que a administração individual de um ou outro (12). O uso individual de coloides não irá prevenir a desidratação, sendo importante a administração de cristaloides isotônicos para diminuir as perdas hidroeletrolíticas (4, 12, 13).

A hipotensão arterial, hiperglicemia, subnutrição, garrote jugular e o uso de glicocorticoides devem ser evitados (4, 12, 13, 28, 29). No caso do reflexo de Cushing, a hipertensão arterial não deve ser tratada pelo risco de isquemia cerebral. O excesso de glicose no SNC pode aumentar a lesão isquêmica (4, 12, 13). Os fluidos glicosados são usados apenas para correção da hipoglicemia (4, 13). Por sua vez, o aspecto nutricional do animal é um fator importante e, ao sétimo dia pós-trauma, almeja-se que o suporte nutricional esteja estabelecido (4). Considera-se, em animais com TCE, a alimentação por sonda gástrica ou nasogástrica, já que os reflexos de deglutição e vômito podem estar deprimidos, aumentando assim o risco de pneumonia por aspiração. Além de não promover constrição jugular, com estufamento em volta do pescoço e tórax, por exemplo, também é preciso evitar a cateterização de uma das jugulares e nunca cateterizar ambas as veias jugulares (4). Manter a cabeça e o corpo do animal elevados, assim como descrito na intervenção pré-hospitalar, em um ângulo máximo de 30° (4, 12).

Como profilaxia de infecções bacterianas, sobretudo em casos de fratura, é indicada administração de antibióticos de largo espectro de ação e com boa penetração no SNC (1, 4, 29). A terapia médica específica para o TCE baseia-se em hiperventilação, tratamento hiperosmolar, administração de altas doses de barbitúricos e cirurgia (1, 4, 12, 13, 29).

O uso de glicocorticoides no tratamento do TCE é muito controverso (4, 12, 29). Segundo Añor (29), corticoides são tidos como benéficos no edema cerebral atribuído a ocorrência de neoplasia. Entretanto, estudos em medicina humana não têm mostrado efeitos benéficos dos corticoides, incluindo metilprednisolona, e succinato de sódio, no tratamento do TCE (4, 29). Na verdade, eles são contra-indicados devido ao aumento da incidência de mortalidade após seu uso. Além disso, eles têm sido associados com aumento dos riscos de infecção, imunossupressão, hiperglicemia e outras significantes alterações metabólicas (3, 4, 12, 13, 29). Baseado nessas premissas, os autores da presente revisão tem evitado o emprego desses medicamentos.

A hiperventilação como forma de diminuir a PIC precisa ser feita com cautela e observação constante dos níveis de CO<sub>2</sub> (4, 28, 29). A hiperventilação leva à hipocapnia e, com isso, vasoconstrição (4, 29). Para diminuir a PIC de maneira satisfatória, a pCO<sub>2</sub> (Pressão de CO<sub>2</sub>) deve ser mantida entre 25-35 mmHg (4, 5, 29). Se permanecer abaixo de 25 mmHg, haverá intensa vasoconstrição e isquemia, o que piora a evolução neurológica (5, 28, 29). A hiperoxigenação é recomendada para maior parte das injúrias cerebrais agudas em animais. A pressão parcial de oxigênio (PaO<sub>2</sub>) deve ser mantida acima de 80 mmHg (4). O oxigênio suplementado pode ser fornecido por máscara facial ou por cateterização nasal. Se o paciente estiver em coma, efetua-se a imediata intubação (4, 6, 11, 28, 29).

A utilização de diuréticos osmóticos como o manitol é muito difundida no tratamento da hipertensão craniana (5, 12, 13). O manitol, um açúcar que é livremente filtrado pelo rim, leva à imediata expansão do plasma reduzindo, assim, a viscosidade sanguínea e aumentando o fluxo sanguíneo cerebral (4, 12). Sua boa função osmótica reverte o gradiente osmótico do sangue cerebral, reduzindo o volume de fluido extracelular e o dano cerebral (1, 3, 4, 12). Administra-se o manitol em *bolus*, por um período de 15 minutos, a fim de se obter o efeito expansor do plasma (5, 6, 12). O efeito de diminuição do edema cerebral leva aproximadamente 15 a 30 minutos para estabilizar, cessando entre 2 e 5 horas. Doses de 0,25g/kg apresentam-se efetivas na diminuição da PIC em relação a doses maiores como 1g/kg, no entanto, com período de latência maior (4, 29). A administração repetida de manitol pode causar intensa diurese, resultar em desidratação celular e conseqüente risco de hipotensão e isquemia (4, 12). Assim, é recomendado que o uso de manitol seja reservado no caso de pacientes críticos (Glasgow modificada de 3-8). Ele também é contra-indicado em pacientes desidratados ou em choque hipovolêmico, assim como em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (ICC), insuficiência renal anúrica ou edema pulmonar, por promover aumento da mortalidade (3, 4, 7, 12). Não há evidências clínicas que o manitol é contra-indicado em casos de hemorragia intracraniana (12). Segundo Platt (12), a combinação do manitol com furosemida, na dose de 0,7 mg/kg, pode diminuir a PIC, sobretudo se o uso da furosemida preceder o manitol. No entanto, é importante entender que não se pode usar em animais desidratados e o seu excesso promove distúrbios hidroeletrólíticos (1, 3, 4, 12). Os fármacos osmóticos são bastante utilizados pelos autores da revisão, contudo o uso isolado ou combinado tem sido estabelecido de acordo com a condição do paciente.

A presença de hipotensão arterial pode necessitar da administração de fármacos vasoativos como a dopamina (2-10 µg/kg/min) (12). Por outro lado, episódios de hipertensão arterial, ocorridos por reflexo de Cushing, por exemplo, devem ser manejados com bloqueio dos canais de cálcio com amlodipina em doses de 0,625 a 1,25 mg por gato, a cada 24 horas, ou 1mg/kg em cães a cada 24 horas (12).

Como forma de diminuir o metabolismo cerebral, a ansiedade e os radicais livres são utilizadas altas doses de barbitúricos (3, 4, 29). Todavia, apesar dos efeitos positivos, pode

haver também hipotensão arterial sistêmica, que eleva a PIC e induz a depressão respiratória (4). Utiliza-se o mesmo para tratar a hipertensão craniana somente quando não houver resposta a outros tratamentos clínicos ou ao cirúrgico (4, 12). Sendo assim, é preconizado como último recurso e o paciente deve ser monitorado de forma intensiva para prevenir complicações à vida (4).

Como sequela do TCE, tem-se a convulsão (1, 4). Em se havendo quadro convulsivo ativo, pode ser tratado com diazepam com 2,0 mg/kg por via retal, se necessário, ou 0,5–1 mg/kg intravenoso (4). Se não houver recidiva, administrar pentobarbital sódico na dose de 3–15 mg/kg, iv, lentamente, até o efeito desejado (12). Após estabilização, verificar a temperatura, pois pode haver hipertermia (4, 12). Embora o papel profilático de anticonvulsivantes não esteja claro, a convulsão agrava a hipertensão intracraniana (3, 12). Por isso, Platt (12) indica a terapia com anticonvulsivante pós-trauma, mesmo que não esteja com quadro convulsivo, com o emprego de fenobarbital 2 mg/kg, im, a cada 6 ou 8 horas. Essa conduta pode ser mantida por 3 a 6 meses após o trauma, sendo diminuída gradativamente quando não houver novas crises. O fenobarbital tem o benefício adicional de reduzir as demandas metabólicas cerebrais, sendo assim um protetor cerebral (4, 12, 29). Além de todas as considerações terapêuticas citadas, tem-se também a possibilidade cirúrgica.

O tratamento cirúrgico em pacientes com TCE é a descompressão pela remoção de massa, por exemplo, remoção de hematoma, hemostasia, redução de fratura e remoção de fragmento craniano (1). Para indicação da cirurgia intracraniana, é pré-requisito a localização precisa da massa agressora por TC ou RM (1, 4, 12). A intervenção é aceita quando há déficits neurológicos graves, deterioração das condições neurológicas, resposta inaceitável à conduta clínica e presença de massa intracraniana cirurgicamente removível (hematoma ou fratura) (4, 12, 26). Seim III (1) sugerem que 100% dos cães e gatos com TCE grave apresentam certo grau de hemorragia intracraniana. São localizações anatômicas comuns de hemorragia intracraniana nestas espécies, o espaço subdural, que só é visualizado em situações de anormalidade, e o subaracnoídeo (1, 12). A descompressão cirúrgica agressiva pela craniotomia pode melhorar o prognóstico do paciente. Como cuidados pré-operatórios devem ser levadas em consideração todas as condutas citadas anteriormente (1, 12, 26, 29). As cirurgias serão abordadas segundo Seim III (1), Platt (12) e Cuddon (26), que as indicam sobretudo para hematomas agudos extra-axiais, fraturas de crânio e hematomas subaracnoides. O acesso para craniotomia pode ser por vias combinadas, que permitam visualização adequada do hematoma intracraniano ou fratura calvária (4, 12, 26). Se estiverem presentes fragmentos ósseos, afundados mais que a espessura do crânio, recomenda-se descompressão pela redução de fratura ou remoção de fragmento ósseo.

Nos hematomas agudos extra-axiais é indicada a craniotomia (3, 12). Se o hematoma for devido a uma fratura em um seio venoso, pode haver sangramento abundante associado à intervenção cirúrgica (1, 30). Transfusões sanguíneas podem ser requeridas na remoção de hematoma e também há risco de hemorragia dos vasos previamente comprimidos (3, 6, 12).

As fraturas da calota craniana podem ou não ter implicações significativas para o paciente (12). Elas são diferenciadas com base no padrão (depressão, cominutivas ou linear) e tipo (aberta ou fechada) (1, 5, 12). Uma fratura é classificada como depressão se a face interna do osso é conduzida para dentro numa profundidade que equivale à largura do crânio (1). Todas as fraturas podem ser manejadas, exceto as mais contaminadas e aquelas com grande número de fragmentos (5, 12). Deve-se remover os fragmentos ósseos e investigar a hemorragia na dura-máter, aracnoide e parênquima cerebral. Se for visto hematoma epidural, subdural ou parenquimatoso, precisa-se evacuar o hematoma e controlar a hemorragia (12). Não é preconizado recolocar os fragmentos da fratura (12). Os hematomas intraparenquimatosos agudos podem formar coágulos e, diferentemente dos extra-axiais, são passíveis de terapia conservadora, a menos que sejam identificados pequenos coágulos intraparenquimatosos na RM durante a fase subaguda (1, 3, 12).



A maioria das contusões hemorrágicas parenquimatosas não requer tratamento cirúrgico (12, 30). A principal indicação cirúrgica para esse tipo de lesão são contusões cerebelares com compressão do IV ventrículo e tronco cerebral (12). A cirurgia visa reduzir o potencial de compressão e hérnia, o que pode se desenvolver em 24 a 48 horas (12, 30). Também para diminuição da compressão intracraniana é possível realizar craniectomia descompressiva, como técnica salvatória para hipertensão não controlada, com medidas clínicas, ventilatórias e posturais (31). No entanto, esta técnica pode levar a complicações cirúrgicas e metabólicas secundárias a retirada de um grande *flap* ósseo da calota craniana, além da necessidade de reintervenção cirúrgica para reconstrução (31).

A hipertensão intracraniana tem melhor prognóstico quando os procedimentos de descompressão são realizados antes da dilatação pupilar se tornar lateral e irreversível (4, 12). Por outro lado, parece inadequado o tratamento cirúrgico sem que antes haja a terapia medicamentosa para diminuir a pressão intracraniana (4, 12, 26). Ainda, quanto ao prognóstico, a doença do tronco encefálico grave é observada pela midríase bilateral (16). A miose unilateral (com ou sem características de Síndrome de Horner) ocorre raramente no TCE e, se houver, deve-se investigar lesão do tronco cerebral ipsilateral, medula espinhal ou do plexo braquial (4, 16). Quanto à reatividade, se ocorrer resposta pupilar deficiente, o prognóstico varia de reservado a pobre e, se não houver resposta pupilar, o prognóstico é grave (3, 4, 12, 26). A taxa de variação da resposta pupilar pode indicar hemorragia, em caso de mudança aguda e edema encefálico, em caso de mudança crônica (3, 4, 26). A terapia para hipertensão craniana tem melhor prognóstico quanto mais cedo for estabelecida, sobretudo antes da dilatação pupilar bilateral irreversível (5, 6). Essa terapia pode ser clínica ou cirúrgica, sendo que a cirúrgica sempre precede a clínica (1, 3, 4, 26).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O profissional deve identificar o TCE pré-hospitalar e tratar o paciente como um indivíduo politraumatizado, incluindo os cuidados com a imobilização. Na terapia hospitalar, os procedimentos de craniotomia são importantes, sobretudo para retirada de coágulos. Além disso, o uso de glicocorticoides precisa ser evitado devido aos efeitos secundários.

## REFERÊNCIAS

1. Seim III HBS. Cirurgia do encéfalo. In: Fossum TW. Cirurgia de pequenos animais. 3ª ed. São Paulo: Elsevier; 2007. p.1379-97.
2. Bagatini T. Evolução dos índices de atropelamento de vertebrados silvestres nas rodovias do entorno da estação ecológica águas emendadas, DF, Brasil, e eficácia de medidas mitigadoras [dissertação]. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília; 2006.
3. Sande A. Traumatic brain injury: a review of pathophysiology and management. J Vet Emerg Crit Care. 2012;20:177-90.
4. Verneau K. Management of head trauma. In: Proceedings of Veterinary Neurology Annual Symposium; 2005, Davis. Davis: VNAS; 2005.
5. Povlisk JT. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2007;24(Suppl 1):1-105.

6. Lorenz MD, Coates JR, Kent M. Stupor or coma. In: Handbook of veterinary neurology. 5<sup>a</sup> ed. United States of America: Elsevier; 2011. p.346-83.
7. Gebhard F, Lang MH. Polytrauma – pathophysiology and management principles. *Langenbecks Arch Chir.* 2008;393:825-31.
8. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido nervoso. In: *Histologia básica.* 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.154-80.
9. Cunningham JG. Neurofisiologia. In: *Tratado de fisiologia veterinária.* 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.33-113.
10. Antunes CA, Barbosa C, Delgado I. Fisiologia celular – sistema nervoso central. In: Antunes CA. *Fisiologia celular: sistema nervoso central.* Lisboa: Universidade Nova de Lisboa; 2005. p.1-12.
11. De Lahunta A, Glass E. Diencephalon. In: *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology.* 3<sup>a</sup> ed. Missouri: Elsevier; 2009. p.476-86.
12. Platt S. Treatment options for head trauma patients. In: *Proceedings of 33rd World Small Animal Veterinary Congress;* 2008, Dublin. Dublin: WSAVG; 2008.
13. Mazzaferro EM. Treatment of head and spinal trauma. In: *Proceedings of the Latinoamericano de emergencia y cuidados intensivos;* 2009, León. Guanajuato: LAVECCS; 2009.
14. Aria MVB. Trauma crânio encefálico: abordagem e tratamento [Internet]. 2007 [acesso em 2011 Ago 18]. Disponível em: <http://bahr-bituricos.blogspot.com/2007/08/trauma-craniano-ab>
15. Ministério da Saúde. Portaria n. 2.048, de 12 de novembro 2002. Regulamento técnico dos Sistemas de Urgência e Emergência. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília (DF), 2002 Nov 12. Sec.1, p. 32.*
16. De Lahunta A, Glass E. Lower motor neuron: general visceral efferent system. In: *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology.* 3<sup>a</sup> ed. Missouri: Elsevier; 2009. p.168-91.
17. Batista SEA. Análise comparativa entre os mecanismos de trauma, as lesões e o perfil de gravidade das vítimas, em Catanduva - SP. *Rev Col Bras Cir.* 2006;33:6-10.
18. Szpilman D. *Manual de primeiros socorros.* São Paulo: Sociedade Brasileira de Salvamento Aquático; 1995.
19. Andrade MB, Cole E, Evêncio Neto J, Silva ACJ, Aleixo GAS, Cunha ALT. Escala de Glasgow pediátrica modificada para cães. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2010;62: 47-53.
20. Governo do Estado do Pará. Secretaria Especial de Defesa Social. Departamento de Trânsito do Estado do Pará. Gerência de Seleção e Treinamento e Desenvolvimento. *Manual de primeiros socorros.* Pará: DAF/CRH; 2003.

21. Thami RP, Souza E, Marques Neto JH. Atendimento pré hospitalar. Centro de educação profissional em atendimento pré hospitalar. Rio de Janeiro: CEPAP; 2008.
22. De Lahunta A, Glass E. The neurologic examination. In: Veterinary neuroanatomy and clinical neurology. 3ª ed. Missouri: Elsevier; 2009. p.487-501.
23. Lorenz MD, Coates JR, Kent M. Neurologic history, neuroanatomy, and neurologic examination. In: Handbook of veterinary neurology. 5ª ed. United States of America: Elsevier; 2011. p.2-36.
24. Taylor MS. Distúrbios neuromusculares. In: Nelson RW, Couto CG. Medicina interna de pequenos animais. 3ª ed. São Paulo: Elsevier; 2006. p.939-68.
25. Risio LD. Neurologic examination and lesion localization. In: Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association. 2005, Mexico City. Mexico: WSAVA; 2005.
26. Cuddon P. Brain trauma. In: Proceedings of the European Veterinary Conference Voorjaarsdagen; 2009, Amsterdam. Netherlands: EVCV; 2009.
27. Feitosa FLF. Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2008.
28. Braund KG. Traumatic disorders: clinical neurology in small animals – localization, diagnosis and treatment. 2003, Ithaca. New York: International Veterinary Information Service; 2003.
29. Añor S. How I treat head trauma. In: Proceedings of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional. 2007, Barcelona. Barcelona, Spain: AVEPA; 2007.
30. Faleiro MR, Pimenta NJG, Faleiro LCM, Cordeiro AF, Maciel CJ, Gusmão SNS. Craniotomia descompressiva para tratamento precoce da hipertensão intracraniana traumática. Arq Neuropsiquiatr. 2005;63(2B):508-13.
31. Mendonça CMF, Medeiros JS, Carvalho MFL, Porto MWS, Valença MM. Craniectomia descompressiva. Neurobiologia. 2010;73:131-40.

**Recebido em: 29/02/12**

**Aceito em: 02/04/12**

## MASTITE BOVINA SOB NANOCONTROLE: A PRÓPOLIS NANOESTRUTURADA COMO NOVA PERSPECTIVA DE TRATAMENTO PARA REBANHOS LEITEIROS ORGÂNICOS

Marcella Zampoli Troncarelli<sup>1</sup>  
Humberto de Mello Brandão<sup>2</sup>  
Juliana Carine Gern<sup>2</sup>  
Alessandro de Sá Guimarães<sup>2</sup>  
Helio Langoni<sup>3</sup>

### RESUMO

A produção orgânica de leite preconiza o uso de medicamentos a base de fitoterapia e homeopatia para o controle da mastite nos rebanhos, em detrimento da administração de antimicrobianos alopatícos convencionais. No entanto, existem escassas opções de ativos disponíveis para este fim. Considerando que a própolis apresenta ação bactericida e trata-se de um composto permitido em sistemas orgânicos de produção leiteira, pesquisadores brasileiros desenvolveram a própolis nanoestruturada, produto promissor para o tratamento intramamário de mastite. Infere-se que a nanoestrutura apresente melhor eficácia antimicrobiana e menor irritabilidade para a glândula mamária, tendo em vista que estudos prévios *in vitro*, realizados frente a estirpes de referência, apresentaram excelentes resultados. Estudos *in vivo* estão sendo realizados para avaliar a inocuidade e a eficácia de uma formulação de própolis nanoestruturada no tratamento intramamário de casos de mastite bovina em rebanhos leiteiros orgânicos. Caso se comprove a eficácia e inocuidade da formulação, estima-se que em breve a mesma possa ser direcionada para produção em escala industrial/comercial, atendendo especialmente à demanda de sistemas orgânicos de produção leiteira.

**Palavras-chave:** vacas, mastite, nanotecnologia, própolis, tratamento.

### BOVINE MASTITIS UNDER NANOCONTROL: NANOSTRUCTURED PROPOLIS AS A NEW PERSPECTIVE OF TREATMENT FOR ORGANIC DAIRY CATTLE

### ABSTRACT

Organic dairy farms are supposed to use only phytotherapeutical and homeopatical actives for mastitis control in cows. However, there are a low number of actives available for this application. Considering the bactericide action of the propolis and the fact that this substance is allowed in organic dairy farms, Brazilian researches developed the nanostructured propolis, a promissor product for intramamary treatment against mastitis. It is expected that this nanostructure presents better antimicrobial effects and lower irritability for mammary glands, considering that the previous *in vitro* studies done against bacterial reference strains showed excellent results. *In vivo* studies are being conducted to evaluate the safety and efficacy of a nanostructured propolis formulation in dairy organic farms. If the expectations regarding the safety and efficacy of the nanostructured propolis be confirmed, betimes the final formulation may be directed for industrial production, especially attending the demands of dairy farms organic systems.

**Keywords:** cows, mastitis, nanotechnology, propolis, treatment.

<sup>1</sup> Pós-doutoranda em Nanotecnologia aplicada ao controle da mastite e à qualidade do leite, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ – UNESP/Botucatu - SP

<sup>2</sup> Laboratório de nanotecnologia aplicada à saúde e produção animal, EMBRAPA Gado de Leite - Juiz de Fora-MG

<sup>3</sup> Professor Titular do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ – UNESP/Botucatu - SP

## MASTITIS BOVINA BAJO CONTROL: EL PROPÓLEO NANOESTRUCTURADO COMO UNA NUEVA PERSPECTIVA DE TRATAMIENTO PARA GANADO LECHERO ORGÁNICO

### RESUMEN

La producción orgánica de leche pregona el uso de fitoterapéuticos y homeopatía para el control de la mastitis en el ganado, en detrimento de la administración de antimicrobianos alopatícos convencionales. Sin embargo, las opciones de sustancias activas disponibles para este fin son todavía escasas. Considerando que el propóleo tiene efecto bactericida y se trata de un compuesto permitido en sistemas orgánicos de producción lechera, investigadores brasileños desarrollaron el propóleo nanoestructurado, producto prometedor para el tratamiento intramamario de mastitis. Se infiere que la nanoestructura presenta más eficacia antimicrobiana y menos irritabilidad para la glándula mamaria, ya que estudios previos in vitro, realizados en estirpes de referencia, presentaron excelentes resultados. Actualmente se realizan estudios in vivo para evaluar la inocuidad y la eficacia de esta formulación de propóleo nanoestructurado en el tratamiento intramamario de la mastitis bovina en ganado lechero orgánico. En el caso de que se compruebe la eficacia e inocuidad de la fórmula, la misma podrá ser direccionada para su producción en escala industrial/comercial, atendiendo especialmente a la demanda de sistemas orgánicos de producción lechera.

**Palabras-clave:** vacas, mastitis, nanotecnología, propóleo, tratamiento.

### INTRODUÇÃO

#### Mastite bovina: importância, implicações econômicas e em Saúde Pública

A mastite bovina - processo inflamatório da glândula mamária, geralmente de origem infecciosa - determina grave impacto no setor leiteiro, causando sérios prejuízos, tanto pelo comprometimento funcional da glândula mamária, com redução da produção de leite, como pelo descarte prematuro de fêmeas e/ou morte ocasional de animais (1,2). A etiologia predominantemente bacteriana da mastite bovina (3) determina menor rendimento industrial na produção de derivados lácteos e principalmente, sério risco à saúde pública, uma vez que as principais espécies de patógenos bacterianos causadores de mastite são produtores de toxinas, muitas delas termorresistentes, ocasionando surtos de toxi-infecções em humanos.

Devido à complexidade epidemiológica da mastite nos rebanhos, seu controle se torna difícil, especialmente em sistemas de criação pouco tecnificados, com manejo higiênico-sanitário deficitário e desprovido de assessoria técnica. Nestas situações, a administração indiscriminada de antimicrobianos para o controle das mastites nos animais tem determinado a seleção de estirpes bacterianas multirresistentes, com consequente redução do êxito terapêutico, ocorrência de mastites recidivantes / crônicas, bem como risco significativo à saúde pública.

Nesse contexto, vale ressaltar os princípios da produção orgânica de leite, que preconizam:

- 1) o uso de medicamentos a base de fitoterapia e homeopatia para o controle da mastite nos rebanhos, em detrimento da administração de antimicrobianos alopatícos convencionais;
- 2) a alimentação livre de cultivo com adubos químicos;
- 3) fornecimento aos animais de fontes alimentares de origem orgânica produzidas, em sua maior parte, na própria unidade.

Estas medidas visam a garantir a não contaminação do leite desde a produção até o envase, atendendo à demanda da sociedade por alimentos de qualidade e integridade garantidas.

## **Sistemas orgânicos de produção leiteira: características, importância econômica, cultural e social**

Leite orgânico é o produto da pecuária leiteira orgânica, que se baseia nas premissas de exploração economicamente viável, ecologicamente correta e socialmente justa. Nesse tipo de exploração, além de os animais serem manejados sem a utilização de antimicrobianos, hormônios, vermífugos, promotores de crescimento, estimulantes de apetite, uréia e demais aditivos não autorizados, é necessário que o pecuarista esteja comprometido com a sustentabilidade da atividade, e que proporcione adequadas condições de trabalho aos seus empregados, sempre visando a excelência do produto a ser obtido. O leite orgânico difere daquele obtido na pecuária convencional por não conter resíduos químicos de qualquer espécie, possuindo mesmo sabor e valor nutritivo, podendo ser consumido puro, sob a forma de lactoderivados ou incorporado a outros produtos alimentícios. Embora sua produção não seja direcionada a um público específico, seus consumidores são, em geral, bem informados, possuem consciência ecológica e buscam a qualidade dos alimentos (4-6).

Esse tipo de leite possui maior valor agregado e, conseqüentemente, custo final mais elevado, restringindo seu consumo diário a uma parcela da população com maior poder aquisitivo. No entanto, existe uma tendência de mudança deste cenário a partir da disponibilização de tecnologias que irão contribuir para redução no custo de produção, aumento da oferta do produto no mercado e, conseqüentemente, redução do preço do leite orgânico nas prateleiras (7).

Estimativas da FAO indicam que o segmento de produtos orgânicos deverá aumentar as vendas em 30% nos países industrializados em dez anos (4). A produção de leite orgânico no Brasil está estimada em aproximadamente 5,5 milhões de litros/ano e, semelhante ao que ocorre nos países desenvolvidos, nos últimos anos, apresenta crescimento anual de 30%, constituindo um promissor subnicho de mercado. Atualmente, em muitos estados da Federação, existem propriedades que adotam o sistema de produção de leite orgânico e, em especial, uma grande concentração de produtores no Estado de São Paulo. Nesta região, por questões culturais e econômicas, destaca-se o município de Botucatu, que responde por aproximadamente cinquenta por cento da produção paulista.

### **Dificuldades no controle da mastite bovina em sistemas orgânicos de produção leiteira**

Na produção orgânica de leite devem ser adotadas medidas higiênico-sanitárias convencionais para a profilaxia da mastite nos animais, recomendando-se a utilização de solução de iodo glicerinado associado à linhaça para a desinfecção dos tetos no pré e pós-dipping. Nos quadros de mastite clínica, indica-se o tratamento à base de homeopatia, argila e/ou fitoterapia, condutas alternativas à terapêutica com antimicrobianos. Ervas medicinais como a camomila, a tansagem, a babosa (espécie não tóxica para os animais), entre outras, são associadas ao tratamento adjuvante com massagem do úbere utilizando pomadas à base de própolis e/ou beladona (7). O tratamento geralmente é realizado de maneira empírica, sem acompanhamento técnico e não há comprovação científica de sua eficácia, inocuidade e reprodutibilidade.

Devido às reduzidas opções terapêuticas que os produtores orgânicos de leite têm para o tratamento da mastite bovina, existe importante demanda de pesquisas que possibilitem o desenvolvimento de novos produtos para este fim, à base de princípios ativos de origem natural (não-sintéticos), cuja eficácia e inocuidade sejam cientificamente comprovadas.

É reconhecido no meio científico que a própolis apresenta ação antimicrobiana, com índices de sensibilidade bacteriana variando de 85,2% a 100% obtidos em testes de antibiograma utilizando estirpes de *Staphylococcus* e *Streptococcus* sp. isoladas de casos de

mastite bovina (8-12). Em estudo para avaliar diferentes opções terapêuticas para o controle de mastite causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros naturalmente infectados (13), utilizou-se formulação de própolis a 30% preparada em solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 20%, para facilitar a difusão no parênquima mamário. Realizou-se tratamento intramamário, após ordenha completa, de manhã e à tarde, durante cinco dias, com 15 a 20 mL da formulação na dependência do tamanho da glândula mamária ou quarto afetado. Corroborando os resultados obtidos pelos mesmos autores quando do estudo da sensibilidade *in vitro* da própolis frente a diferentes amostras de *Prototheca zopfii*, obteve-se *in vivo* cura clínica e microbiológica em 84,8% dos tetos tratados. Por outro lado, apesar de resultados satisfatórios obtidos nestas pesquisas, existem poucos estudos de eficácia (*in vitro* e *in vivo*) e de inocuidade reportados na literatura científica.

Evidencia-se que a própolis trata-se de composto permitido para utilização no tratamento da mastite em bovinos criados em sistema orgânico de produção. Considerando estas características, e vislumbrando a possibilidade de desenvolver um novo produto intramamário que atendesse a demanda dos produtores de leite orgânico, a EMBRAPA Gado de Leite (Juiz de Fora-MG), em parceria com outras instituições de ensino e pesquisa brasileiros, após diversos anos de estudos utilizando o conceito de nanotecnologia, desenvolveram a própolis nanoestruturada, cuja eficácia *in vitro* apresentou-se comparativamente superior à da própolis íntegra natural frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* de referência. Durante o processo de produção e estabilização das nanopartículas, foram utilizadas moléculas anfifílicas (simultaneamente polares e apolares) biocompatíveis, e condições especiais para se obter um produto livre de álcool. Neste contexto, a nanoprópolis pode ser potencialmente menos irritativa ao tecido mamário em comparação aos extratos alcoólicos rotineiramente utilizados em formulações intramamárias para bovinos, que geralmente determinam processos inflamatórios na glândula (14). Desta forma, infere-se que o processo de nanoestruturação possibilitaria a otimização da eficácia terapêutica e inocuidade da própolis, quando administrada nos animais.

### Princípio da Nanotecnologia

De acordo com a Organização Internacional de Padronização (15), nanotecnologia é definida no documento de consulta pública ISO/DTS 80004-1 (2010) para definição do marco regulatório como sendo “a aplicação do conhecimento científico para manipular e controlar a matéria em escala nanométrica e, com isso, fazer uso de propriedades e fenômenos que são dependentes de tamanho e estrutura, e simultaneamente distintos daqueles associados com os átomos ou as moléculas individuais ou com os materiais na forma de agregados” (16).

Por sua vez, o Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (17) assume que a nanotecnologia não pode ter uma definição somente, dada a sua interdisciplinaridade nas áreas de química, física, biologia e engenharia (Figura 1). Devido ao grande número de definições, há ainda muita divergência sobre o tema, mas parece ser senso comum a noção de que a nanotecnologia esteja associada ao aparecimento ou mudança (aumento/diminuição) de uma característica da matéria associada à redução de escala de pelo menos uma de suas dimensões (16).

Na prática, as características físicas, químicas e biológicas de uma determinada substância são determinadas pela somatória dos fenômenos físico-químicos que atuam sobre a matéria como, por exemplo, a força gravitacional, a inércia, o atrito, o movimento Browniano, as interações eletrostáticas, as repulsões elétricas, entre outros (18). Ao avaliar essa substância na escala métrica, sabe-se que a mesma sofre ação de todos os fenômenos supracitados, embora alguns em maior intensidade que outros, como são os casos da gravidade, do atrito e da inércia que acabam por se sobrepor aos demais. Entretanto, à medida que essa substância tem seu tamanho reduzido, a importância dessas forças se modifica e, adicionalmente, sua

área superficial por unidade de massa é drasticamente aumentada. Por volta dos 100 nm, os átomos que compõem a partícula ficam mais instáveis em relação à sua forma métrica, necessitando, portanto, de uma menor quantidade de energia para separá-los (19). Com isso, a substância além de poder apresentar novas características físicas e químicas, também pode demonstrar maior reatividade e solubilidade, dependendo do meio onde se encontra. Adicionalmente, quando no interior da nanopartícula, o princípio ativo tem sua estabilidade aumentada, uma vez que permanece protegido de agentes oxidantes, enzimas ou mesmo interação química com outras moléculas (16). Este fenômeno torna-se relevante especialmente no caso de produtos desenvolvidos para o tratamento de mastite bovina, uma vez que em processos inflamatórios da glândula mamária existe uma série de alterações físico-químicas que usualmente interferem na ação dos princípios ativos convencionais.

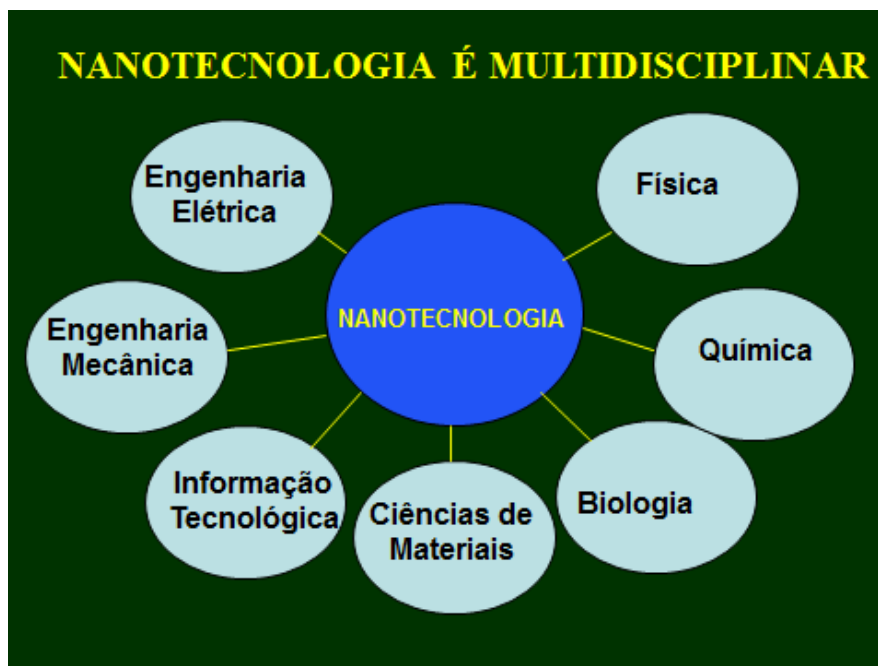


Figura 1. As diferentes interfaces da Nanotecnologia. Fonte: DURÁN, N. UMC/UNICAMP, "Nanotecnologia e Nanobiotecnologia" - Curso-QP-434 (1/08/2007). Disponível em: <http://www.nanobiotec.iqm.unicamp.br/download/CURSO-NANOBIOTECH-1-2007-2.ppt>

Leite orgânico é o produto da pecuária leiteira orgânica, que se baseia nas premissas de exploração economicamente viável, ecologicamente correta e socialmente justa. Nesse tipo de exploração, além de os animais serem manejados sem a utilização de antimicrobianos, hormônios, vermífugos, promotores de crescimento, estimulantes de apetite, uréia e demais aditivos não autorizados, é necessário que o pecuarista esteja comprometido com a sustentabilidade da atividade, e que proporcione adequadas condições de trabalho aos seus empregados, sempre visando a excelência do produto a ser obtido. O leite orgânico difere daquele obtido na pecuária convencional por não conter resíduos químicos de qualquer espécie, possuindo mesmo sabor e valor nutritivo, podendo ser consumido puro, sob a forma de lactoderivados ou incorporado a outros produtos alimentícios. Embora sua produção não seja direcionada a um público específico, seus consumidores são, em geral, bem informados, possuem consciência ecológica e buscam a qualidade dos alimentos (4-6).

Esse tipo de leite possui maior valor agregado e, conseqüentemente, custo final mais elevado, restringindo seu consumo diário a uma parcela da população com maior poder aquisitivo. No entanto, existe uma tendência de mudança deste cenário a partir da disponibilização de tecnologias que irão contribuir para redução no custo de produção,



aumento da oferta do produto no mercado e, conseqüentemente, redução do preço do leite orgânico nas prateleiras (7).

Estimativas da FAO indicam que o segmento de produtos orgânicos deverá aumentar as vendas em 30% nos países industrializados em dez anos (4). A produção de leite orgânico no Brasil está estimada em aproximadamente 5,5 milhões de litros/ano e, semelhante ao que ocorre nos países desenvolvidos, nos últimos anos, apresenta crescimento anual de 30%, constituindo um promissor subnicho de mercado. Atualmente, em muitos estados da Federação, existem propriedades que adotam o sistema de produção de leite orgânico e, em especial, uma grande concentração de produtores no Estado de São Paulo. Nesta região, por questões culturais e econômicas, destaca-se o município de Botucatu, que responde por aproximadamente cinquenta por cento da produção paulista.

### **Dificuldades no controle da mastite bovina em sistemas orgânicos de produção leiteira**

Na produção orgânica de leite devem ser adotadas medidas higiênico-sanitárias convencionais para a profilaxia da mastite nos animais, recomendando-se a utilização de solução de iodo glicerinado associado à linhaça para a desinfecção dos tetos no pré e pós-dipping. Nos quadros de mastite clínica, indica-se o tratamento à base de homeopatia, argila e/ou fitoterapia, condutas alternativas à terapêutica com antimicrobianos. Ervas medicinais como a camomila, a tansagem, a babosa (espécie não tóxica para os animais), entre outras, são associadas ao tratamento adjuvante com massagem do úbere utilizando pomadas à base de própolis e/ou beladona (7). O tratamento geralmente é realizado de maneira empírica, sem acompanhamento técnico e não há comprovação científica de sua eficácia, inocuidade e reprodutibilidade.

Devido às reduzidas opções terapêuticas que os produtores orgânicos de leite têm para o tratamento da mastite bovina, existe importante demanda de pesquisas que possibilitem o desenvolvimento de novos produtos para este fim, à base de princípios ativos de origem natural (não-sintéticos), cuja eficácia e inocuidade sejam cientificamente comprovadas.

É reconhecido no meio científico que a própolis apresenta ação antimicrobiana, com índices de sensibilidade bacteriana variando de 85,2% a 100% obtidos em testes de antibiograma utilizando estirpes de *Staphylococcus* e *Streptococcus* sp. isoladas de casos de mastite bovina (8-12). Em estudo para avaliar diferentes opções terapêuticas para o controle de mastite causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros naturalmente infectados (13), utilizou-se formulação de própolis a 30% preparada em solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 20%, para facilitar a difusão no parênquima mamário. Realizou-se tratamento intramamário, após ordenha completa, de manhã e à tarde, durante cinco dias, com 15 a 20 mL da formulação na dependência do tamanho da glândula mamária ou quarto afetado. Corroborando os resultados obtidos pelos mesmos autores quando do estudo da sensibilidade *in vitro* da própolis frente a diferentes amostras de *Prototheca zopfii*, obteve-se *in vivo* cura clínica e microbiológica em 84,8% dos tetos tratados. Por outro lado, apesar de resultados satisfatórios obtidos nestas pesquisas, existem poucos estudos de eficácia (*in vitro* e *in vivo*) e de inocuidade reportados na literatura científica.

Evidencia-se que a própolis trata-se de composto permitido para utilização no tratamento da mastite em bovinos criados em sistema orgânico de produção. Considerando estas características, e vislumbrando a possibilidade de desenvolver um novo produto intramamário que atendesse a demanda dos produtores de leite orgânico, a EMBRAPA Gado de Leite (Juiz de Fora-MG), em parceria com outras instituições de ensino e pesquisa brasileiros, após diversos anos de estudos utilizando o conceito de nanotecnologia, desenvolveram a própolis nanoestruturada, cuja eficácia *in vitro* apresentou-se comparativamente superior à da própolis íntegra natural frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* de referência. Durante o processo de produção e estabilização das nanopartículas,

foram utilizadas moléculas anfifílicas (simultaneamente polares e apolares) biocompatíveis, e condições especiais para se obter um produto livre de álcool. Neste contexto, a nanoprópolis pode ser potencialmente menos irritativa ao tecido mamário em comparação aos extratos alcoólicos rotineiramente utilizados em formulações intramamárias para bovinos, que geralmente determinam processos inflamatórios na glândula (14). Desta forma, infere-se que o processo de nanoestruturação possibilitaria a otimização da eficácia terapêutica e inocuidade da própolis, quando administrada nos animais.

### **Princípio da Nanotecnologia**

De acordo com a Organização Internacional de Padronização (15), nanotecnologia é definida no documento de consulta pública ISO/DTS 80004-1 (2010) para definição do marco regulatório como sendo “a aplicação do conhecimento científico para manipular e controlar a matéria em escala nanométrica e, com isso, fazer uso de propriedades e fenômenos que são dependentes de tamanho e estrutura, e simultaneamente distintos daqueles associados com os átomos ou as moléculas individuais ou com os materiais na forma de agregados” (16).

Por sua vez, o Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (17) assume que a nanotecnologia não pode ter uma definição somente, dada a sua interdisciplinaridade nas áreas de química, física, biologia e engenharia (Figura 1). Devido ao grande número de definições, há ainda muita divergência sobre o tema, mas parece ser senso comum a noção de que a nanotecnologia esteja associada ao aparecimento ou mudança (aumento/diminuição) de uma característica da matéria associada à redução de escala de pelo menos uma de suas dimensões (16).

Na prática, as características físicas, químicas e biológicas de uma determinada substância são determinadas pela somatória dos fenômenos físico-químicos que atuam sobre a matéria como, por exemplo, a força gravitacional, a inércia, o atrito, o movimento Browniano, as interações eletrostáticas, as repulsões elétricas, entre outros (18). Ao avaliar essa substância na escala métrica, sabe-se que a mesma sofre ação de todos os fenômenos supracitados, embora alguns em maior intensidade que outros, como são os casos da gravidade, do atrito e da inércia que acabam por se sobrepor aos demais. Entretanto, à medida que essa substância tem seu tamanho reduzido, a importância dessas forças se modifica e, adicionalmente, sua área superficial por unidade de massa é drasticamente aumentada. Por volta dos 100 nm, os átomos que compõem a partícula ficam mais instáveis em relação à sua forma métrica, necessitando, portanto, de uma menor quantidade de energia para separá-los (19). Com isso, a substância além de poder apresentar novas características físicas e químicas, também pode demonstrar maior reatividade e solubilidade, dependendo do meio onde se encontra. Adicionalmente, quando no interior da nanopartícula, o princípio ativo tem sua estabilidade aumentada, uma vez que permanece protegido de agentes oxidantes, enzimas ou mesmo interação química com outras moléculas (16). Este fenômeno torna-se relevante especialmente no caso de produtos desenvolvidos para o tratamento de mastite bovina, uma vez que em processos inflamatórios da glândula mamária existe uma série de alterações físico-químicas que usualmente interferem na ação dos princípios ativos convencionais.

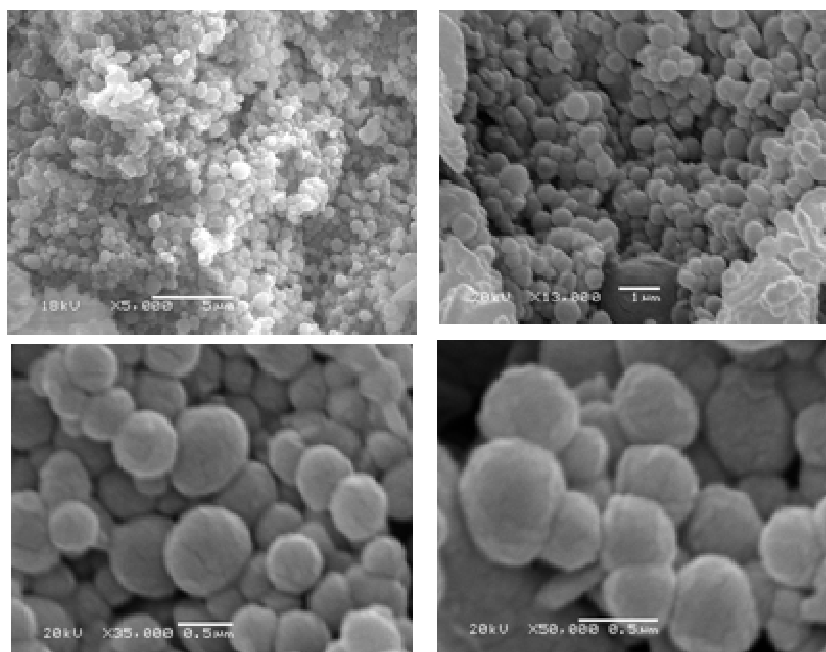


Figura 2. Microscopia eletrônica de nanopartículas. Fonte: MARCATO, P.D. E DURÁN, N., 2006. Extraído de: DURÁN, UMC/UNICAMP, “Nanotecnologia e Nanobiotecnologia” - Curso-QP-434 (1/08/2007). Disponível em: <http://www.nanobiotec.iqm.unicamp.br/download/CURSO-NANOBIOPARTE-1-2007-2.ppt>

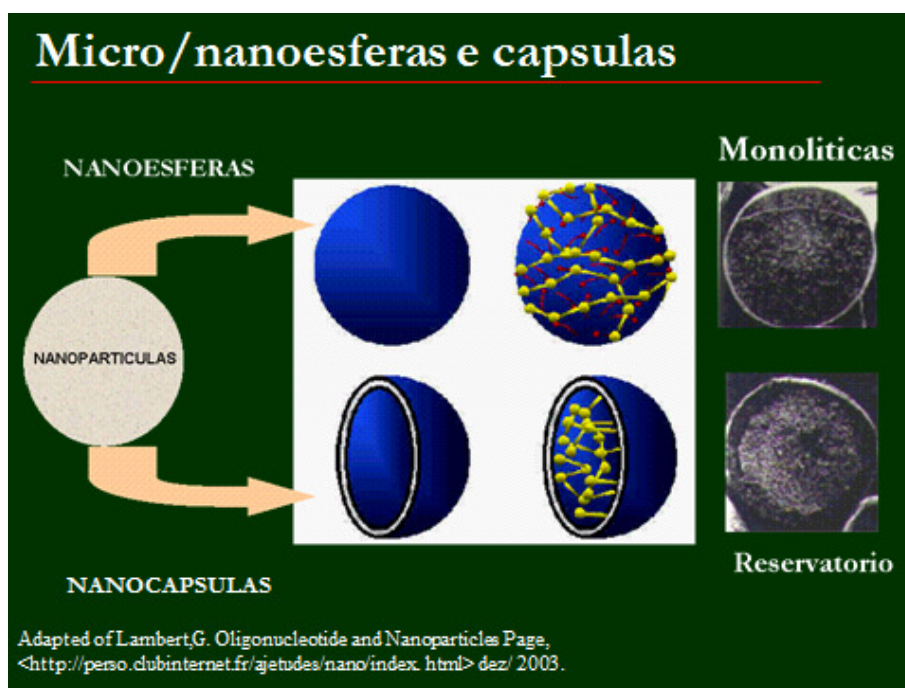


Figura 3. Representação esquemática de nanoesferas e nanocápsulas. Fonte: DURÁN, N. UMC/UNICAMP, “Nanotecnologia e Nanobiotecnologia” - Curso-QP-434 (1/08/2007). Disponível em: <http://www.nanobiotec.iqm.unicamp.br/download/CURSO-NANOBIOPARTE-1-2007-2.ppt>

Como exemplo de tais benefícios, destaca-se o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes para o tratamento de neoplasias, determinando menor toxicidade e resistência celular ao fármaco, comparativamente aos quimioterápicos tradicionais. Em estudo realizado e 2009, avaliou-se a doxorubicina e o paclitaxel, dois princípios ativos que, quando utilizados

em conjunto no tratamento de carcinomas ovarianos, são muito eficientes no tratamento, contudo apresentam elevada toxicidade. Os pesquisadores verificaram que estes ativos, ao serem estruturados em nanopartículas lipídicas e testados contra linhagens celulares de carcinoma multirresistente, mostraram-se altamente efetivos no controle de crescimento e simultaneamente menos tóxicos nos ensaios de citotoxicidade (24).

Em outro estudo, utilizou-se nanopartículas de indometacina, um antiinflamatório não esteroide de uso rotineiro em medicina humana, com aplicações a cada oito horas. Ensaios *in vitro* indicaram que quando incorporada em nanopartículas de poli-n-vinilpirrolidona, a liberação sustentada de indometacina pode permitir a administração do medicamento a cada doze horas. Esse resultados foi obtido em função do efeito de liberação sustentada do medicamento promovido pelo nanocarreador (25).

O emprego da nanotecnologia em ativos antimicrobianos também tem apresentado resultados satisfatórios. A penicilina é o principal e mais antigo antimicrobiano representante do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, que por décadas vem sendo utilizado no tratamento de infecções bacterianas. Todavia, seu uso indiscriminado culminou na seleção de estirpes de *S. aureus* resistentes (denominados metacilina resistentes-MRSA). Um estudo possibilitou a ligação covalente de penicilina a uma cadeia de poliacrilato, com estruturação de nanopartículas de aproximadamente 100nm. Os pesquisadores compararam a atividade *in vitro* da molécula nanoestruturada com uma formulação convencional. Nas estirpes MRSA, a formulação nanoestruturada se mostrou mais eficaz, o que foi atribuído a uma provável proteção do princípio ativo contra ação das  $\beta$ -lactamases bacterianas e/ou proteção contra as proteínas ligadoras de penicilina (26).

### **Nanotecnologia em Medicina Veterinária**

Nas áreas de produção e sanidade animal existem poucos relatos da utilização de nanoestruturas. Maior eficácia *in vitro* de estreptomina e doxiciclina foi obtida em pesquisa, quando estes ativos foram nanoestruturados e utilizados frente a linhagens de *Brucella melitensis* (27). Este patógeno usualmente permanece no interior de macrófagos dos animais, tornando o controle farmacológico limitado e laborioso. Neste estudo, os antimicrobianos foram encapsulados em nanocomplexos de PEO-b-PAA (polímero anfifílico), proporcionando o direcionamento das nanopartículas para o interior de macrófagos murinos *in vitro*. Ao ser testada em modelos *in vivo* (murinos infectados), a formulação nanoestruturada determinou redução de 79% das unidades formadoras de colônias (UFCs) em relação ao grupo controle, valor este superior à formulação convencional ( $P < 0,05$ ).

### **Nanotecnologia para o controle da mastite bovina**

O uso de iodo povidine estruturado em nanoesferas de PLGA (polímero de ácido láctico-coglicólico) foi proposto para tratamento intramamário de mastite (28). O iodo povidine trata-se de potente e inespecífico anti-séptico, frequentemente utilizado para a desinfecção de superfícies e de pele. Os estudos se restringiram a padrões de liberação do princípio ativo *in vitro* sem que ocorresse a sua compatibilização com algum modelo biológico. Mais recentemente, na tentativa de contornar as limitações dos tratamentos convencionais de mastite estafilocócica, pesquisadores da EMBRAPA de Gado de Leite (Juiz de Fora-MG) e da UFOP (Universidade Federal de Ouro Preto) desenvolveram uma formulação de uso intramamário (que se encontra em teste de fase clínica II) (29), na qual as nanopartículas são capazes de direcionar o antimicrobiano para a superfície do epitélio glandular e para o interior de polimorfonucleares, aumentando, desta maneira, a concentração do princípio ativo em compartimentos intracelulares.

Com vistas a atender à demanda do setor de produção orgânica de leite, foi desenvolvida pela EMBRAPA Gado de Leite (Juiz de Fora), em conjunto com parceiros, a nanoprópolis, que constitui uma perspectiva promissora para o controle da mastite nos rebanhos. Estudos pilotos demonstraram que a própolis nanoestruturada apresenta excelente biodisponibilidade e ação antimicrobiana, associada à adequada inocuidade e ausência de resíduos no leite, por se tratar de um composto de base natural. A figura 3 ilustra por intermédio de um microscópio de força atômica as características esféricas da nanoprópolis que está sendo avaliado em estudos in vivo, em conjunto com a FMVZ UNESP Botucatu-SP, e em breve os resultados serão divulgados.

### Vantagens e potencialidades do uso de nanopartículas em Medicina Veterinária

A nanotecnologia permite não só o desenvolvimento de novos produtos, mas também a possibilidade de retrabalhar substâncias para a obtenção de melhores resultados (20).

Destacam-se como consequências práticas da nanoestruturação de uma determinada substância farmacêutica (16):

- 1) uso mais racional de medicamentos, uma vez que tanto o número de doses quanto a concentração podem ser reduzidos durante o tratamento;
- 2) “rejuvenescimento” de bases farmacêuticas já desgastadas pelo uso contínuo;
- 3) uso de novas vias de aplicação de medicamentos e vacinas;
- 4) menor geração de resíduos em produtos de origem animal.
- 5) menor estresse de aplicação medicamentosa;
- 6) redução de toxicidade e efeitos adversos de tradicionais bases farmacêuticas;
- 8) uso de novas moléculas e novos compósitos na terapêutica animal;
- 7) dentre outras perspectivas.

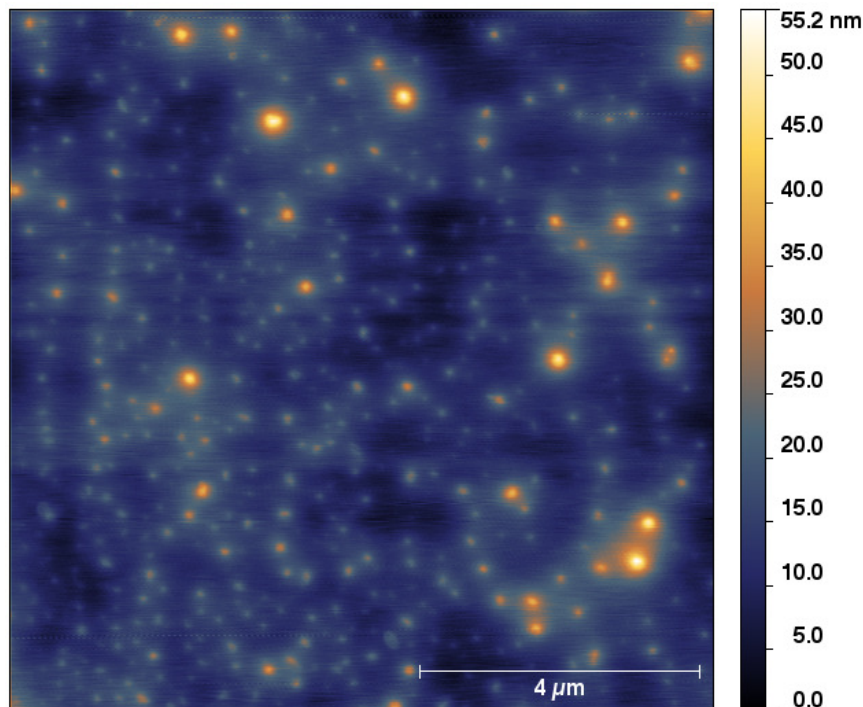


Figura 3. Fotomicroscopia de força atômica da nanoprópolis, que auxilia na sua biodisponibilidade e ação antimicrobiana. Fonte: GERN e BERNARDES-FILHO, 2012.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescente aumento da demanda mundial por alimentos implica no desenvolvimento e adoção de novas tecnologias no setor produtivo agropecuário. Considerando que o conceito moderno de pecuária sustentável leva em consideração o aumento da produtividade sem, contudo, descuidar dos aspectos ambientais, de segurança de alimento, de bem estar animal, sociais, culturais, trabalhistas, políticos e econômicos, cria-se uma janela de oportunidades para o desenvolvimento de produtos e processos inovadores que os contemple.

Com base nesta visão, para que a nanoprópolis se transforme em um produto inovador que atenda a uma clara demanda de mercado (*i.e.* produtos intramamários para o segmento orgânico), estudos *in vivo* estão sendo realizados por duas renomadas instituições de ensino e pesquisa nacionais, em parceria científica firmada e com apoio da FAPESP, para avaliar a inocuidade e a eficácia de uma formulação de própolis nanoestruturada no tratamento intramamário de casos de mastite bovina em rebanhos leiteiros orgânicos. Caso se comprove a eficácia e inocuidade da formulação patenteada, que foi premiada como terceiro melhor produto na competição mundial de produtos “Idea to Product” em Estocolmo, em novembro de 2012, a mesma poderá ser direcionada para produção em escala industrial/comercial, atendendo especialmente à demanda de sistemas orgânicos de produção leiteira.

## REFERÊNCIAS

1. Mota RA, Pinheiro Júnior JW, Silva DR, Silveira NSS, Gomes SM, Silva LBG et al. 2004. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do estado de Pernambuco. Rev. Napgama, 7(1):10-13.
2. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2007. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 10ª ed.
3. Bradley AJ. Bovine mastitis: an evolving disease. 2002. Vet. Journal, 164(2):116-128.
4. Soares JPG. Produção Orgânica de Leite - Qualidade e Segurança Alimentar. Embrapa Agrobiologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: < <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/leite-seguro.html>> Acesso em: 22/11/2012.
5. Langoni H, Sakiyama DTP, Guimarães FF, Menozzi, BD, Da Silva RC. 2009. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. Pesq. Vet. Bras. 29(11):881-886.
6. Ribeiro MG, Geraldo JS, Langoni H, Lara GHB, Siqueira AK, Salerno T, Fernandes MC. 2009. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. Pesq. Vet. Bras. 29(1):52-58.
7. Castro CRT, Pires MFA, Aroeira LJ. Produção de Leite Orgânico. EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora-MG. Disponível em: < <http://www.planetaorganico.com.br/trab-leiteorganico.htm>> Acesso em: 22/11/2012.
8. Langoni H, Domingues PF, Funari SRC, Chande CG, Neves IR. Efeito antimicrobiano “in vitro” da própolis. 1996. Arq. Bras. Vet. Zootec., 48:227-229.

9. Sforcin JM, Fernandes Júnior A, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity 2000. *J. of Ethnopharmacol.*, 73:243-249.
10. Pinto MS, Faria JE, Message D, Cassini STA, Pereira CS, Gioso MM. 2001. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas de leite de vacas com mastite. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, 38:278-283.
11. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antim. Agents and Chemot.*, 46:1302-1309.
12. Loguercio AP, Groff ACM, Pedrozzo AF, Witt NM, Sá e Silva AM, Vargas AC. 2006. Atividade in vitro do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41(2):347-349.
13. Langoni H, Domingues PF, Silva RF, Tavares HL, Mota RA, Rocha NS et al. 1995. *Prototheca zopfii* como agente de mastite bovina: Clínica e Terapêutica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*; 47:727-752.
14. Pereira LS, Botteon RCCM. Efeito da aplicação intramamária de própolis sobre a composição do leite e a contagem de células somáticas. 35º Conbravet – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. In: Anais... 19-22 de outubro de 2008. Gramado-RS.
15. ISO [International Organization for Standardization]. ISO/DTS 80004-1 Nanotechnologies-Vocabulary- Part I: Core Terms. 2010, 16p.
16. Brandão HM, Gern JC, Vicentini NM, Pereira MM, Andrade PVD. 2011. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. *Rev. CFMV*, ano XVII(53):61-67.
17. INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual. Nanotecnologia, 2009.
18. Medeiros ES, Paterno LG, Mattoso LHC. 2006. Nanotecnologia. In: Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. Artiliber (ed), São Paulo. 208p.
19. Cao G. 2004. Nanostructures & nanomaterials: Synthesis, properties & applications. Imperial College Press. England. 2004, 435p. <[http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Ez1dYxO\\_ma8C&oi=fnd&pg=PR5&dq=Nanostructures+%26+nanomaterials:+Synthesis,+properties+%26+applications&ots=2eI6bG4RS2&sig=IjSoeRMUGVtWNbZWudCA2maNCvw#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Ez1dYxO_ma8C&oi=fnd&pg=PR5&dq=Nanostructures+%26+nanomaterials:+Synthesis,+properties+%26+applications&ots=2eI6bG4RS2&sig=IjSoeRMUGVtWNbZWudCA2maNCvw#v=onepage&q&f=false)>
20. Madureira EH. 2011. Entrevista sobre desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas para uso veterinário, incluindo emprego de micro e nanopartículas. *Rev. CFMV*, Ano XVII(53):5-8.
21. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Rel.*,70:1–20.
22. Couvreur P, Barrat G, Fattal E, Legrand P, Vautthier C. 2002. Nanocapsule Technology: a review. *Critical Rev. Therap. Drug Car. Sys.*, 19:99-134.

23. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.*, 2:8-21.
24. Dong X, Mattingly CA, Tseng MT, Cho MJ, Liu Y, Adams VR. et al. 2009. Doxorubicin and Paclitaxel-Loaded Lipid-Based Nanoparticles Overcome Multidrug Resistance by Inhibiting P-Glycoprotein and Depleting ATP. *Cancer Res.*, 69(9):3918-3926.
25. Kuskov AN, Voskresenskaya AA, Goryachaya AV, Shtilman MI., Spandidos DA, Rizos AK. et al. 2010. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for non-steroidal anti-inflammatory drugs: Characterization and in vitro controlled release of indomethacin. *Int. J. Mol. Med.*, 26(1):85-94.
26. Turos E, Reddy GSK, Greenhalgh K, Ramaraju P, Abeylath SC, Jang S. et al. Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles: Restoring the activity of b-lactam antibiotics against MRSA. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, v.17, p.3468–3472, 2007.
27. Seleem MN, Jain N, Pothayee N, Ranjan A, Riffle JS, Sriranganathan N. 2009. Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. *FEMS Microbiol. Letter*, 294:24–31.
28. Park H, Han H. 2002. Production and characterization of biodegradable povidine-iodine as intrammary disinfectant. *J. Vet. Sci.*, 64(8):739-741.
29. Mosqueira VCF, Araujo RS, Brandão HM. 2010. Composição nanoparticulada de uso animal. 2010, BR PI 1002601-0.

**Recebido em: 15/02/13**

**Aceito em: 03/04/13**



## Comitê de Avaliadores

Adelina Maria da Silva	Delphim da Graça Macoris	José Carlos de Andrade Moura
Adjair Antônio do Nascimento	Denise Botelho de O. Braga	José Cezar Panetta
Adriana Evangelista-Rodrigues	Dilermando Miranda da Fonseca	José Dantas Ribeiro Filho
Adriano Sakai Okamoto	Dirlei Antônio Berto	José de Angelis Cortes
Ailton Vitor Pereira	Domingos da Silva Leite	José Domingos Guimarães
Alan Maia Borges	Edson Ramos de Siqueira	José Fernando Machado Menten
Alessandro F. T. Amarante	Eduardo Arruda T. Lanna	José Joaquim Tilton Ranzani
Alexander Welker Biondo	Eduardo Bagagli	José Juradir Fagliari
Alexandre Lima de Andrade	Eduardo Francisquine Delgado	José Laerte Nörnberg
Alexandre Oba	Eduardo Furtado Flores	José Luiz Catão Dias
Alexandre Secorun Borges	Eduardo Harry Birgel Júnior	José Luiz Laus
Alexandre Vaz Pires	Eduardo Paulino da Costa	José Maurício Sforcin
Alice Maria Melville P. Della Libera	Edviges Maristela Pituco	José Nicolau Prospero Puoli Filho
Alice Fernandes Alfieri	Eliana Curvelo	José Paes de A. N. Pinto
Alicio Martins Júnior	Eliana Roxo	José Paes de Oliveira Filho
Alda Lúcia Gomes Monteiro	Elizabeth Oliveira da Costa	José Rafael Modolo
Altivo José de Castro	Élvio Carlos Moreira	José Roberto Kfoury Júnior
Alvimar José da Costa	Enrico Lippi Ortolani	José Roberto Sartori
Amauri Alcindo Alfieri	Evelise Oliveira Telles	José Vasconcelos Lima Oliveira
Américo G. da Silva Sobrinho	Fabiano Montiani Ferreira	Joselito Nunes Costa
Ana Carolina B. C. Fonseca Pinto	Felipe Masiero Salvani	Jovanir I. Müller Fernandes
Ana Liz Garcia Alves	Fernanda da Cruz L. e Alvarenga	Juliany Gomes Quitzan
Ana Paula Frederico R. L. Bracarense	Fernando Antônio de Avila	Julieta Rodini Engrácia de Moraes
Ana Sílvia A. M. T. Moura	Fernando Ferreira	Júlio César de Freitas
Ana Terezinha Tavechio	Fernando Pandolfo Bortolozzo	Júlio Lopes Siqueira
Andrey Pereira Lage	Flávia de Rezende Eugênio	Kátia Denise Saraiva Bresciani
Andrigo Barboza de Nardi	Flavio Ruas de Moraes	Kleber Tomás de Resende
Ângelo João Stopiglia	Francisco Carlos Faria Lobato	Laerte Ferreira
Annelise de Souza Traldi	Francisco José Teixeira Neto	Lara Borges Keid
Antônio Carlos Alessi	Francisco Leydson Formiga Feitosa	Leandro Rodello
Antonio Carlos Cunha Lacreta Júnior	Frederico Ozanam Papa	Leucio Câmara Alves
Antônio Carlos Paes	Geder Paulo Herrmann	Lílian Gregory
Antonio João Scandolera	Germano Francisco Biondi	Lisiane de A. Martins
Antônio José de Araújo Aguiar	Gervásio Henrique Bechara	Lissandro Gonçalves Conceição
Antonio Nader Filho	Gilson Helio Toniollo	Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini
Antônio Sérgio Ferraudó	Guilherme Jordão Magalhães Rosa	Luciana Morganti Ferreira Maselli
Antonio Waldir Cunha da Silva	Gustavo Ferrer Carneiro	Luciano José da Costa Figueiredo
Aparecido Antônio Camacho	Helenice de Lima González	Luís Carlos Vulcano
Aramis Augusto Pinto	Helenice de Souza Spinosa	Luís Gustavo Corbellini
Áureo Evangelista Santana	Helio José Montassier	Luiz Alberto do Lago
Bernardete Miranda dos Santos	Henrique Nunes de Oliveira	Luiz Antônio Mathias
Bruna P. A. da Fonseca	Humberto Tonhati	Luiz Augusto do Amaral
Bruno Watanabe Minto	Idércio Luiz Sinhorini	Luiz Carlos de Souza
Caris Maroni Nunes	Iolanda Aparecida Nunes	Luiz Celso Hygino da Cruz
Carla Forte Maiolino Molento	Ivan Roque de Barros Filho	Luiz Ernani Henkes
Carla Lopes de Mendonça	Ivanete Kotait	Luiz Fernando de O. S. Carvalho
Carlos Alberto de M. Lopes	Ivanete Susin	Luiz Francisco Prata
Carlos Antônio de Miranda Bomfim	Iveraldo dos Santos Dutra	Luiz Henrique Zafalon
Carlos Augusto A. Valadão	Ivo Wentz	Luiz Henrique de Araújo Machado
Carlos Roberto Conti Naumann	Izidoro Francisco Sartor	Luzia Helena Queiroz
Carlos Roberto Daleck	Jackson Victor de Araújo	Magda Alves de Medeiros
Carlos Roberto Teixeira	Jane Megid	Marcelo Bahia Labruna
Carolina Madeira Lucci	Jean Carlos Ramos da Silva	Marcelo Beltrão Molento
Cassiano Victória	Jean Guilherme F. Joaquim	Marcelo George Mungai Chacur
Cecílio Soares Filho	Jener Alexandre S. Zuanon	Marcelo Meller Alievi
Célia Regina Orlandelli Carrer	João Carlos Pinheiro Ferreira	Marcelo Resende de Souza
Celso A. Rodrigues	João Guilherme P. Filho	Marcelo Vasconcelos Meireles
Cezinande de Meira	João Luiz Horácio Faccini	Márcia C. da Sena Oliveira
Ciniro Costa	João Pessoa Araújo Júnior	Márcia Marinho
Cláudia Valéria S. Brandão	João Ricardo Dittrich	Márcia Marques Jericó
Cláudio Dias Timm	José Antônio Marques	Márcia Valéria Rizzo S. Szabó
Claudio Scapinello	José Antônio Viana	Marcia Oliveira Lopes
Daisy Pontes Netto	José Antônio Visintin	Marcílio Dias S. da Mota
Daniel Augusto Barroso Lessa	José Augusto B. Afonso	Márcio Machado Ladeira
Dante Pazzanese Duarte Lanna	José Carlos de Andrade Moura	Marco A. F. Lopes

Marco Antonio Alvarenga	Oswaldo Durival Rossi Junior	Rogério Martins Amorim
Marco Antonio Gioso	Pacífico Antônio Diniz Belém	Ronaldo Lopes Oliveira
Marco Antonio Lemos de Oliveira	Paulo Alberto Lovatto	Rosana M. O. Clark
Marconi Rodrigues de Farias	Paulo César Ciarlini	Rosângela Zacarias Machado
Marcos Amaku	Paulo Fernando Machado	Rosângela Locatelli Dittrich
Marcos Chalhoub Coelho Lima	Paulo Francisco Domingues	Ruben Pablo Schocken-Iturrino
Marcos Jun Watanabe	Paulo Henrique Franceschini	Rubens Antônio Carneiro
Marcos Veiga dos Santos	Paulo Henrique Jorge da Cunha	Samir Issa Samara
Margareth Elide Genovez	Paulo Michel Roehle	Sandra de Moraes Gimenes Bosco
Maria Angélica Miglino	Paulo Roberto Brandão	Sandra Mara Araújo Crispim
Maria Cecília Rui Luvizotto	Paulo Roberto de Lima Meirelles	Sebastião de Campos Valadares Filho
Maria da Glória Buzinaro	Paulo Roberto Rodrigues Ramos	Sergio Borges Mano
Maria de Lourdes R. S. da Cunha	Pedro Manuel Leal Germano	Sheila Canavese Rahal
Maria Denise Lopes	Peterson Triches Dornbusch	Silvia M. Nishida
Maria Gisela Laranjeira	Priscilla Anne Melville	Silvia Maria Alves Gomes
Maria Jaqueline Manprim	Raimundo Souza Lopes	Simone Baldini Lucheis
Maria Lucia Gomes Lorenço	Raphael Lúcio Andreatti Filho	Simone de Carvalho Balian
Maria Lúcia Zaidan Dagli	Raquel Y. A. Baccarim	Simone Tostes de Oliveira
Maria Luiza Delavechia	Raul Franzolin Neto	Sonia Regina Pinheiro
Maria Madalena Pessoa Guerra	Raul José Silva Giro	Sony Dimas Bicudo
Maria Terezinha S. Peraçoli	Regina Kiomi Takahira	Stefano Hagen
Márcia Valéria Rizzo S. Szabó	Renato Campanarut Barnabé	Stélio Pacca Loureiro Luna
Maria Verônica de Souza	Renato Cesar Sacchetto Tôres	Teresa C. G. de O. Siqueira
Marilena Longo Büll	Renato Silva de Sousa	Tereza Cristina C. da Silva
Marília Martins Melo	Renée Laufer Amorim	Tilde Rodrigues Froes
Marion Burkhardt de Koivisto	Ricardo Augusto Mendonça Vieira	Valéria Marçal Félix de Lima
Mary Marcondes	Ricardo de Oliveira Orsi	Valéria Nobre L. S. Oliva
Mauricio Costa Alves da Silva	Ricardo J. Del Carlo	Vamilton Alvares Santarém
Mayra Elena O. D'Avila Assumpção	Roberta Lemos Freire	Vanerli Beloti
Milton Hissashi Yamamura	Roberto Antonio Rodella	Vania Maria de V. Machado
Mitika Kuribayashi Hagiwara	Roberto Calderón Gonçalves	Venício José de Andrade
Mônica Vicky Bahr Arias	Roberto de Oliveira Roça	Vera Lúcia M. Hall
Nei Moreira	Roberto Sartori Filho	Victor Cruz Rodrigues
Nelson Carneiro Baião	Roberto Soares de Castro	Virgínia Bodelão Richini Pereira
Nelson Moraes	Rodrigo Martins Soares	Wagner dos Reis
Nereu Carlos Preste	Rodrigo Otávio Silveira Silva	Wagner Luis Ferreira
Nilson Roberto Benites	Rogério de Paula Lana	William Koury Filho
Noeme Sousa Rocha	Rogério Giufrida	Wilter Ricardo R. Vicente

## REVISTA “VETERINÁRIA E ZOOTECNIA”

## NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

## ARTIGOS CIENTÍFICOS

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

## 1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, do lado direito da página. Digitá-los, separados um por linha, com **chamadas** de rodapé numeradas e em sobrescrito, **que indicarão** o cargo e o endereço profissional dos autores, seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

## 2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaçamento simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen, devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palavras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

## 3. A estrutura do artigo deverá conter:

**Introdução:** Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

**Material e Métodos:** Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

**Resultados:** Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. **Fotografias** podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de **desenhos originais**, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade.

**Discussão:** Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

**Conclusões:** É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

**Referências:** Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

**Deverão** ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar **numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página**. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

## ARTIGOS DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão 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. Estafilococis em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

#### 5 Conference paper

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

#### 6 Dissertation

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

#### 7 Electronic material on Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <<http://www.milkpoint.com.br>>.



## REVISTA “VETERINARIA Y ZOOTECNIA”

### NORMAS PARA PRESENTACIÓN DE TRABAJOS

La Revista **Veterinaria y Zootecnia**, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, publica artículos científicos originales, artículos de revisión de bibliografía, estudios de caso y comunicaciones cortas, relacionadas con las áreas de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, con periodicidad semestral, en las lenguas Portugués, Español o Inglés, siendo los conceptos y opiniones emitidas, de exclusiva responsabilidad de los autores.

La publicación depende de la evaluación preliminar del Presidente del Consejo Editorial, que analiza la relevancia, y los aspectos formales, de acuerdo con la categoría del artículo sometido y las normas editoriales establecidas. Si es aprobado, se adopta el mérito de la evaluación por pares, se envía para dos Revisores, de acuerdo con el área. Los conceptos además de la imparcialidad, serán mantenidos bajo estricta reserva, sin que exista la posibilidad de identificación entre autores y evaluadores. Los artículos no publicados serán devueltos.

Los trabajos deben ser enviados pela página WEB de la revista <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>

**Prof. Helio Langoni**

**Revista “Veterinaria y Zootecnia”**

**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu**

**18618-000 – Dist. Rubião Junior – SP – Brasil**

### INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

#### ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Deben ser estructurados de acuerdo con los siguientes puntos:

**1. Página principal, con:**

- Título del trabajo en portugués, inglés y en español, tipo de letra Times New Roman, número 12, con espacio entre líneas sencillo, en negrilla y centrado, en letra mayúscula. Cuando sea necesario, indicar la entidad que financia la investigación, como primer pie 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 pie** 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 3º Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

### **6 Tesis**

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

### **7 Medios electrónicos en Internet**

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <<http://www.milkpoint.com.br>>.