

# **Veterinária e Zootecnia**

**Vet e Zootec.**

**2015 dezembro; 22(4): 493-662**

**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**

**ISSN Impresso 0102-5716**

**ISSN Eletrônico 2178-3764**

**Botucatu - SP – Brasil**

## Veterinária e Zootecnia

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

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

Publicação trimestral  
Solicita-se permuta / *Exchange desired*  
Biblioteca do Campus de Botucatu  
18618-970 – Distrito de Rubião Júnior – Botucatu – SP – Brasil

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

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

Trimestral  
Texto em português/inglês/espanhol  
Descrição baseada em: Vol. 22, n.1, mar. (2015)  
ISSN Impresso 0102-5716  
ISSN Eletrônico 2178-3764

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

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

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Administração Geral da UNESP**

**Reitor**

Prof. Dr. Julio Cezar Durigan

**Vice-Reitor**

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

**Pró-Reitor de Pesquisa**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Denise Lopes

Botucatu  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
FMVZ  
2015

**EXPEDIENTE****Comissão Editorial**

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

**Assessoria Técnica**

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

**Normalização Bibliográfica:** Rinaldo José Ortiz

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

**Secretaria: Apoio:** Wellington Ricardo Guerra

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

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

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

**Prof. Dr. Helio Langoni**

**Revista “Veterinária e Zootecnia”**

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

**18618-970 - Dist. Rubião Junior, s/n – SP – Brasil**

## Corpo Editorial

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

## SUMÁRIO/CONTENTS/SUMARIO

EDITORIAL .....	500
ARTIGOS DE REVISÃO/REVIEW ARTICLES/ARTÍCULOS DE REVISIÓN	
<b>TOXOCARIÁSE HUMANA: RISCO DE INFECÇÃO ALIMENTAR?/ HUMAN TOXOCARIASIS: FOODBORNE INFECTION RISK? / TOXOCARISIS HUMANA: RIESGO DE INFECCIÓN ALIMENTARIA?.</b> Adriana Lebram von Söhsten, Aristeu Vieira da Silva .....	501
<b>ESTUDO DA MATURIDADE FETAL CANINA EM FASE FINAL DE GESTAÇÃO: APLICABILIDADE DIAGNÓSTICA/ STUDY OF CANINE FETAL MATURITY, EMPHASIZING FINAL STAGE OF GESTATION, AND DIAGNOSTIC APPLICABILITY / ESTUDIO DE LA MADUREZ FETAL CANINA AL FINAL DEL EMBARAZO: APLICABILIDAD DE DIAGNÓSTICO.</b> Fernanda Gonçalves Canello, Vívian Tavares Almeida, Aline Eyko Kawanami, Guadalupe Sampaio Ferreira, Mariana Dulce Delle Vedove Ortolan, Maria Emília Franco Oliveira, Marcus Antonio Rossi Feliciano, Wilter Ricardo Russiano Vicente.....	513
<b>AVALIAÇÃO DOS PADRÕES DE VITALIDADE DO NEONATO EQUINO – REVISÃO DE LITERATURA / EVALUATION OF PATTERNS OF VITALITY OF EQUINE NEONATE - REVIEW OF THE LITERATURE / EVALUACIÓN DE LAS NORMAS DE VITALIDAD DEL RECIÉN NACIDO EQUINO – REVISIÓN DE LITERATURA.</b> Raíssa Karolliny Salgueiro Cruz, Angélica Alfonso, Maria Lúcia Gomes Lourenço, Simone Biagio Chiacchio.....	522
<b>O COBRE COMO SUPERFÍCIE DE CONTATO ANTIMICROBIANA E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NA MEDICINA VETERINÁRIA / THE COPPER AS AN ANTIMICROBIAL TOUCH SURFACE AND ITS POTENTIAL APPLICATION IN VETERINARY MEDICINE / EL COBRE COMO SUPERFICIE DE CONTACTO ANTIMICROBIANA Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA MEDICINA VETERINÁRIA.</b> Ronise Faria Rohde Depner, Rômulo Alexandre Depner, Vivian Lucca, Maristela Lovato .....	532
<b>SYSTEMATIC REVIEW: THE IMPORTANCE OF WATER IN THE EPIDEMIOLOGY OF CRYPTOSPORIDIOSIS IN BRAZIL / REVISÃO SISTEMÁTICA: A IMPORTÂNCIA DA ÁGUA NA EPIDEMIOLOGIA DA CRIPTOSPORIDIOSE NO BRASIL/ REVISIÓN SISTEMÁTICA: LA IMPORTANCIA DEL AGUA EN LA CRIPTOSPORIDIOSIS EPIDEMIOLOGÍA EN BRASIL.</b> Luiz da Silveira Neto, Sandra Valéria Inácio, Katia Denise Saraiva Bresciani.....	544
<b>CIRURGIAS RECONSTRUTIVAS DA BEXIGA EM PEQUENOS ANIMAIS: INDICAÇÕES E PRINCIPAIS TÉCNICAS / RECONSTRUCTIVE SURGERIES OF BLADDER IN SMALL ANIMALS: INDICATIONS AND MAIN TECHNIQUES / CIRUGÍAS RECONSTRUTIVAS DE LA VEJIGA EN PEQUEÑOS ANIMALES: INDICACIONES Y PRINCIPALES TÉCNICAS.</b> Cláudia Valéria Seullner Brandão, Victor José Vieira Rossetto, Lídia Mitsuko Matsubara .....	555
RELATOS DE CASO/CASE REPORTS/ESTUDIOS DE CASO	
<b>ADENOCARCINOMA PULMONAR EM VACA NELORE: RELATO DE CASO/ PULMONARY ADENOCARCINOMA IN NELORE COW: CASE REPORT / ADENOCARCINOMA PULMONAR EN VACA DE RAZA NELORE: RELATO DEL CASO.</b> Bianca Paola Santarosa, Gabriela Nascimento Dantas, Noeme Sousa Rocha, Celso Antonio Rodrigues, Simone Biagio Chiacchio, José Paes Oliveira-Filho, Rogério Martins Amorim, Roberto Calderon Gonçalves .....	569
<b>LINFOMA INTRAVASCULAR DE CÉLULAS T EM CÃO / INTRAVASCULAR T-CELL LYMPHOMA IN DOG / LINFOMA INTRAVASCULAR DE CÉLULAS T EN PERRO.</b> Letícia Batelli de Oliveira, Juliano Nóbrega, Renee Laufer-Amorim, Fabiano José Ferreira de Sant'Ana, Janildo Ludolf Reis Junior.....	575

## ARTIGOS/ARTICLES/ARTÍCULOS

- DETECÇÃO MOLECULAR DE *Leishmania* spp. EM MATERIAL DE HEMOCULTURA, E DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE EM CÃES PROCEDENTES DO BAIRRO DA CONQUISTA, SÃO MANUEL-SP, BRASIL / MOLECULAR DETECTION OF *Leishmania* spp. IN BLOOD CULTURE MATERIAL, AND LEISHMANIASIS SEROLOGICAL DIAGNOSIS IN DOGS FROM BAIRRO DA CONQUISTA, SAO MANUEL, BRAZIL / DETECCIÓN MOLECULAR DE *Leishmania* spp. EN MATERIAL DE HEMOCULTIVO, Y DIAGNOSTICO SOROLOGICO PARA LEISHMANIASIS EN PERROS DEL BARRIO DE LA CONQUISTA, SÃO MANUEL-SP, BRASIL.** Helio Langoni, Virginia Bodelão Richini-Pereira, Carlos Scremin, Marcella Zampoli Troncarelli, Janaina Biotto Camargo, Juliana Giantomassi Machado, Leila Sabrina Ullmann, Felipe Freitas Guimarães, Daniela Barbosa Silva, Gabriela Pacheco Sánchez, Simone Baldini Lucheis .....580
- SOROEPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR TOXOPLASMA GONDII EM GATOS ATENDIDOS EM HOSPITAL VETERINÁRIO DE BOTUCATU, SP, BRASIL/ SEROEPIDEMIOLOGY OF TOXOPLASMA GONDII INFECTION IN CATS ATTENDED AT VETERINARY HOSPITAL OF BOTUCATU, SP, BRAZIL / SEROEPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCIÓN POR TOXOPLASMA GONDII EN GATOS CONSULTADOS EN EL HOSPITAL VETERINÁRIO DE BOTUCATU, SP, BRASIL.** José Francisco Antunes Ribeiro, Alessandra Melchert, Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães-Okamoto, Joyce Cappa Mittestainer, Sâmia Fernandes Joaquim, Raissa Saran Sartori, Daniele Silvano Gonçalves, Hélio Langoni.....591
- HEMATOLOGIA DO *Mylossoma duriventre* (SERRASALMIDAE) DA BACIA DO RIO SOLIMÕES, AMAZÔNIA CENTRAL (BRASIL) / HEMATOLOGY OF THE *Mylossoma duriventre* (SERRASALMIDAE) FROM THE SOLIMÕES RIVER BASIN, CENTRAL AMAZON (BRAZIL) / HEMATOLOGÍA DE *Mylossoma duriventre* (SERRASALMIDAE) DE LA CUENCA SOLIMÕES, AMAZONIA CENTRAL (BRASIL).** Michel Nasser Corrêa Lima Chamy, Rafael Pinto Souza, Anderson Gomes Costa, Marcos Tavares-Dias .....597
- PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO OMENTO MAIOR, TECIDO ADIPOSEO PERIRRENAL E BOLSA ADIPOSEA INTERESCAPULAR EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)/ PROLIFERATION AND VIABILITY OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS DERIVED FROM OMENTUM, FAT PERIRENAL AND ADIPOSE INTERSCAPULAR POUCH IN RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*)/ PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DERIVADAS DEL ESTROMA MESENQUIMAL DE EPIPLÓN, EL TEJIDO ADIPOSEO PERIRRENAL Y EL BOLSO DE GRASA INTERESCAPULAR EN CONEJOS (*Oryctolagus cuniculus*).** Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho, Tiago Luis Eilers Treichel, Jaime Sardá Aramburú Junior, Maurício Borges da Rosa, Maurício Veloso Brun, Marcella Teixeira Linhares, Bianca Eidt Rodrigues, Alexandre Krause, Marcos André Braz Vaz, Fabíola Dalmolin, Ney Luis Pippi.....607
- OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-NEOSPORA CANINUM E ESTUDO DOS FATORES DE RISCO EM CÃES DE CUIABÁ E VARZÉA GRANDE-MT, ATENDIDOS EM HOSPITAL VETERINÁRIO / OCURENCY OF ANTIBODIES ANTI-*Neospora caninum* AND STUDY OF RISK FACTORS IN DOGS FROM CUIABÁ AND VÁRZEA GRANDE – MT, TREATED IN THE VETERINARY HOSPITAL / OCURRENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Neospora caninum* Y ESTUDIO DE LOS FACTORES DE RIESGO EN PERROS EN CUIABÁ Y VARZEA GRANDE-MT, SERVIDO EN HOSPITAL VETERINARIO.** Michelle Igarashi, Luciana Aparecida dos Santos, Alexandre Mendes Amude, Livia Saab Muraro, Daniel Moura Aguiar, Andréia Lima Tome Melo, Thábata dos Anjos Pacheco, Risia Lopes Negreiros, Rafael Rodrigues da Silva .....619
- ACCURACY OF A MULTIPLEX PCR PROTOCOL FOR *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* AND *Escherichia coli* DETECTION IN BULK TANKS / ACURÁCIA DE PROTOCOLO DE MULTIPLEX PCR PARA DETECÇÃO DE *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* E *Escherichia coli* EM TANQUES DE EXPANSÃO / ACURACIA DE UN PROTOCOLO DE MULTIPLEX PCR PARA LA DETECCION DE *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* Y *Escherichia coli* EN TANQUES ENFRIADORES.** Marcella Zampoli Troncarelli, Helio Langoni, Virginia Bodelão Richini-Pereira, Pâmela M. Marson, Rodrigo Costa Da Silva .....625

**AVALIAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO E LÁCTEO EM OVELHAS GESTANTES SUPLEMENTADAS COM MONENSINA SÓDICA/ EVALUATION OF HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROFILE IN PREGNANT EWES SUPPLEMENTED WITH MONENSIN / EVALUACIÓN DE LOS PERFILES HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y LECHOSO EN OVEJAS EN EMBARAZO SUPLEMENTADAS CON MONENSINA SÓDICA.** Elizabeth Hortêncio, Rodolfo Cavalcanti Souto, Saulo Tarso Silva, Jobson F. P. Cajueiro, Carla Lopes Mendonça, Pierre Castro Soares, José Augusto Bastos Afonso .....634



## EDITORIAL

## INCERTEZAS E EXPECTATIVAS

Com tantas incertezas e expectativas sobre o futuro e estabilidade da economia e do nosso país, uma certeza é a publicação do volume 22, número 4 de 2015. Mesmo com todo o desânimo reinante no país, a Assessoria, parceiros importantes para o êxito da Revista, trabalhou a contento, permitindo a sua continuidade. À ela queremos renovar os nossos agradecimentos e também desejar Feliz Natal e Ano Novo repleto de realizações, pois já conseguimos avistar o Natal, bem como 2016. Que as esperanças se renovem e que consigamos estar juntos novamente com muito otimismo. Muito obrigado!

Momentos de festa são realmente para festejar, então deixemos de lado a preocupação, permitindo que somente uma energia positiva nos acompanhe e permaneça conosco em 2016. Concentremo-nos em nossas responsabilidades e, independente das áreas de atuação, pensemos no meio ambiente e em sua saúde, já que vivemos o conceito de saúde única – dos humanos, dos animais e do meio ambiente –, pois em tempos de Dengue, Chikungunya e Zika, temos que estar mais atentos. Sejamos, pois, educadores ambientais em um país onde há muito por se fazer nesse sentido.

O presente número da Revista Veterinária e Zootecnia traz artigos interessantes inéditos, contribuindo com o desenvolvimento científico em diferentes áreas do conhecimento. Como artigos de revisão: Toxocaríase humana: risco de infecção alimentar?; Estudo da maturidade fetal canina em fase final de gestação: aplicabilidade diagnóstica; Avaliação dos padrões de vitalidade do neonato equino – Revisão de literatura; O cobre como superfície de contato antimicrobiana e sua potencial aplicação na Medicina Veterinária; Systematic review: the importance of water in the epidemiology of cryptosporidiosis in Brazil; Cirurgias reconstrutivas da bexiga em pequenos animais: indicações e principais técnicas. Os relatos de caso: Adenocarcinoma pulmonar em vaca Nelore: relato de caso; Linfoma intravascular de células T em cão. Os artigos originais: Detecção molecular de *Leishmania spp.* em material de hemocultura, e diagnóstico sorológico para leishmaniose em cães procedentes do Bairro da Conquista, São Manuel-SP, Brasil; Soroepidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii* em gatos atendidos em hospital veterinário de Botucatu, SP, Brasil; Hematologia do *Mylossoma duriventre* (serrasalmidæ) da Bacia do Rio Solimões, Amazônia Central (Brasil); Proliferação e viabilidade de células-tronco derivadas do omento maior, tecido adiposo perirrenal e bolsa adiposa interescapular em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*); Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e estudo dos fatores de risco em cães de Cuiabá e Varzêa Grande-MT, atendidos em hospital veterinário; Accuracy of a multiplex PCR protocol for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* detection in bulk tanks; Avaliação do perfil hematológico, bioquímico e lácteo em ovelhas gestantes suplementadas com monensina sódica.

**Prof. Helio Langoni**  
Editor-Chefe

**TOXOCARIÁSE HUMANA: RISCO DE INFECÇÃO ALIMENTAR?\***

Adriana Lebram von Söhsten<sup>1</sup>  
Aristeu Vieira da Silva<sup>2</sup>

**RESUMO**

A infecção humana por *Toxocara canis* ou por *T. cati* pode levar a uma série de síndromes denominadas toxocaríase visceral, toxocaríase ocular, a neurotoxocaríase e a toxocaríase oculta. Normalmente, a infecção humana se dá pela ingestão de ovos larvados presentes no solo, água, alimentos ou no pelo de animais infectados, mas a literatura registra uma série de casos onde as infecções podem ser devidas a ingestão de larvas em hospedeiros paratênicos, normalmente aves ou bovinos. Este trabalho revisa os casos humanos atribuídos à ingestão de produtos de origem animal, bem como a ocorrência e estudo da infecção por *T. canis* e *T. cati* em animais de produção.

**Palavras-chave:** *Toxocara*, *larva migrans*, paratênico, alimento.

**HUMAN TOXOCARIASIS: FOODBORNE INFECTION RISK?****ABSTRACT**

Human infection by *Toxocara canis* or *T. cati* can lead to a series of syndromes known as visceral toxocariasis, ocular toxocariasis, neurotoxocariasis and covert toxocariasis. Human's infection occurs mainly by ingestion of eggs with larvae present in soil, water, food or fur of infected animals, but the literature records a series of cases where infections can be caused by ingestion of larvae in paratenic hosts, usually birds or cattle. This work reviews the human cases attributed to the ingestion of products of animal origin, the natural occurrence and experimental infections by *T. canis* and *T. cati* in food animals.

**Keywords:** *Toxocara*, *larva migrans*, paratenic, food.

**TOXOCARISIS HUMANA: RIESGO DE INFECCIÓN ALIMENTARIA?****RESUMEN**

La infección humana por *Toxocara canis* o *T. cati* puede conducir a una serie de síndromes conocidas como toxocariasis visceral, toxocariasis ocular, neurotoxocariasis y toxocariasis oculta. Normalmente se produce la infección del humano por ingestión de huevos larvados presentes en el suelo, agua, alimentos o animales infectados, pero la literatura registra una serie de casos donde las infecciones pueden ser causadas por la ingestión de larvas en hospederos paratênicos, generalmente aves o ganado. Este trabajo revisa los casos humanos atribuidos a la ingestión de productos de origen animal, ocurrencia y estudio de la infección por *T. canis* y *T. cati* en animales de producción.

**Palabras clave:** *Toxocara*, *larva migrans*, paratênico, alimento.

---

\* Projeto de pesquisa financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico – CNPq; os autores contam com bolsa de Mestrado (CAPES) e de produtividade em pesquisa (CNPq).

<sup>1</sup> Mestrando em Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública. Universidade Estadual de Feira de Santana. Contato principal para correspondência.

## INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços tecnológicos e do incremento da saúde e das condições de vida, em todo o mundo, os parasitos de uma forma geral, e os parasitos intestinais em especial, encontram-se entre os maiores contribuintes à prevalência de infecções e enfermidades, tanto em animais como no homem. Entre os organismos que causam doenças no ser humano, 25% encontram-se taxonomicamente caracterizados como helmintos e protozoários, e entre estes se destacam como agentes de infecção nas regiões tropicais, helmintos como *Ascaris*, Ancilostomídeos, *Trichuris*, além dos protozoários *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia* e *Toxoplasma* (1).

Algumas das principais infecções parasitárias animais e humanas são transmitidas pela ingestão de solo ou de alimentos contaminados, destacando-se entre elas a toxocaríase, causada pelos helmintos *Toxocara canis* e *Toxocara cati*, parasitos intestinais relatados em cães e gatos há mais de 200 anos, e que causam síndromes viscerais ou oculares no homem (2). Hotez e Wilkins (3) apontam que a toxocaríase é a infecção parasitária mais comum nos norte-americanos de classes sociais desfavorecidas, de elevada prevalência nos países em desenvolvimento e que sua importância na maior parte do mundo provavelmente é subestimada.

Cães e gatos podem ser infectados pela ingestão de ovos larvados ou de hospedeiros paratênicos com larvas teciduais, em qualquer idade, e após ciclo de migração extra-intestinal que abrange o fígado e pulmões, os parasitos se estabelecem no intestino delgado, aonde chegam à fase adulta e passam a eliminar ovos. Em cães reinfetados, as larvas não completam o ciclo e podem encistar em vários tecidos; no caso das fêmeas, podem ser transferidos para o feto durante a gravidez (*T. canis*) ou pela via transmamária (*T. canis* e *T. cati*) (4).

Nos humanos e outros hospedeiros paratênicos, a infecção se dá pela ingestão de ovos larvados presentes no solo, água, alimentos e no pelo de animais infectados. As larvas são liberadas no intestino, fazem migração extra-intestinal, mas encistam em diversos órgãos e tecidos, onde podem permanecer viáveis. No ser humano podem alojar-se no fígado, pulmões, cérebro e olho, causando as síndromes características (5).

Este trabalho teve como objetivo revisar a literatura mundial sobre a ocorrência de infecções por *Toxocara* em animais de produção, bem como os relatos de toxocaríase humana associada à ingestão de produtos de origem animal, avaliando estes como fontes de infecção humana.

### Prevalência e fatores de risco da infecção humana

Desde a década de 1950, a infecção do ser humano por larvas de *T. canis* tem sido descrita, sendo caracterizada, principalmente em crianças, por eosinofilia intensa, hepatomegalia, sintomas respiratórios, anemia e apetite depravado (6). Síndromes oculares e o comprometimento do sistema nervoso central também têm sido relatados, sendo uma causa de cegueira e distúrbios neurológicos e psiquiátricos (7). No Brasil, a infecção pelo parasito tem sido registrada principalmente em inquéritos soropidemiológicos (8,9).

A Tabela 1 sumaria os resultados de 25 estudos soropidemiológicos para pesquisa de anticorpos anti-*Toxocara* em crianças e adultos no Brasil, publicados entre 1990 e 2014. Naqueles trabalhos que relatam a associação de fatores epidemiológicos, normalmente a infecção pelo *Toxocara* está ou associada ao contato com o solo ou presença dos hospedeiros carnívoros. Apenas dois trabalhos (10,11) levantaram dados sobre o consumo de produtos cárneos, sem encontrarem associação com a infecção pelo parasito.

Tabela 1. Local, número de amostras (N), porcentagem de positivos (P) para a presença de anticorpos anti-*Toxocara* spp. e fatores associados, segundo a referência (Ref.) consultada.

Local	N	P (%)	Ref.	Fatores associados
São Paulo (SP)	593	3,7	(12)	Não relata
Campinas (SP)	275	4,0	(12)	Não relata
Santos (SP)	309	5,3	(12)	Não relata
Marília (SP)	353	2,2	(12)	Não relata
Presidente Prudente (SP)	495	2,8	(12)	Não relata
Campinas (SP)	138	23,9	(13)	Ausência de tratamento da água, ausência de instalações sanitárias, ausência de muro no quintal
Pedro de Toledo (SP)	70	50,0	(14)	Não relata
Pedro de Toledo (SP)	107*	31,8	(14)	Não relata
São Paulo (SP)	399	38,8	(15)	Onicofagia, quintal sujo, morar em favela, baixa renda
Taubaté (SP)	604*	67,2	(16)	Idade acima de 20 anos
Sorocaba (SP)	180	38,3	(17)	Viver no subúrbio, casa com quintal, rua não pavimentada, tratamento prévio de animais com vermífugo
São Paulo (SP)	338	26,9	(18)	Não relata
Acrelândia (AC)**	606	21,5	(19)	Não relata
Maringá (PR)	450	28,8	(20)	Menos de 5 anos de idade, brincar em caixa de areia, ter gato em casa
Goiânia (GO)	1131	18,9	(21)	Consumo de água não filtrada, presença de cães no domicílio ou peridomicílio, vizinhos com cães, geofagia
Astorga (PR)***	376	51,6	(22)	Ter menos de cinco anos de idade
Presidente Prudente (SP)	252	11,1	(23)	Sexo masculino, presença de gato
Salvador (BA)	338	59,5	(24)	Classe social, contato com cão, contato com gato
Acrelândia (AC)	1112	38,0	(10)	Ausência de tratamento da água, deficiência de vitamina A, presença de geo-helmintos
Umuarama (PR)	90	17,8	(25)	Brincar na praça seis ou sete vezes na semana, densidade de contaminação, presença de ovos no peridomicílio, geofagia, idade até 4 anos, presença de cão parasitado
Marialva (PR)****	353	36,8	(26)	Não relata
Salvador (BA)	1309	48,4	(27)	Mais de oito anos de idade, viver em casa onde a rua é pavimentada, presença de cão e gato na casa
Presidente Prudente (SP)	253	8,7	(11)	Contato com solo
Pontal do Paranapanema (SP)	194*	14,4	(28)	Nenhuma variável associada
Pelotas (RS)	427	50,6	(29)	Não relata
Salvador (BA)	1445	47,8	(30)	Não relata
Fernandópolis (SP)	252	15,5	(31)	Geofagia

\*Zona rural; \*\*inclui Assis Brasil; \*\*\*inclui Mandaguá e Nova Esperança; \*\*\*\* inclui Mandaguari e Paçandu

## Infecção humana pelo *Toxocara* pela via alimentar

Entre as formas de infecção do homem por *Toxocara* spp., a mais usualmente aceita é a ingestão de solo contaminado com ovos deste helminto, mas a ingestão de verduras contaminadas com ovos, o contato com pelos de animais parasitados e a ingestão parcial ou total de hospedeiros paratênicos, tais como galinhas, patos, bovinos e suínos, e mesmo de minhocas, apesar de ser documentada (4), não foi ainda estudada de maneira regular, com poucos estudos sobre a recuperação de larvas do parasito a partir de vísceras de hospedeiros paratênicos naturalmente infectados. Lim (32) considera que a infecção pelo parasito é subdiagnosticada, e que naquelas regiões onde o consumo de vísceras e tecidos crus ou malcozidos de animais é um hábito, a via alimentar pode ser uma importante fonte de infecção.

Na Áustria, Deutz et al. (33) pesquisaram a presença de anticorpos anti-*T.canis* no soro de 585 fazendeiros, médicos veterinários, magarefes e caçadores, encontrando soropositividade em 44%, 27%, 25% e 17% dos indivíduos, respectivamente. Estas taxas representaram uma chance de ocorrência 39, 18, 16 e nove vezes maior nestes indivíduos, respectivamente, em relação ao grupo controle, onde a frequência de positivos foi de 2%. Os autores associam os resultados em fazendeiros e veterinários ao contato com cães e gatos na zona rural, mas não exploram a possibilidade do contato com carcaças contaminadas no caso dos magarefes.

Morimatsu et al. (34), em área urbana no Japão, descrevem dois casos, pai e filho, acometidos com febre, fadiga, cefaleia, tosse e eliminação de escarro viscoso. Intensa eosinofilia foi um dos achados hematológicos, e anticorpos anti-*Toxocara* foram detectados em soro e no lavado brônquio-alveolar. Ambos tinham histórico de consumo de carne e vísceras de frangos, e foram recuperadas larvas de *Toxocara* do fígado das aves criadas no domicílio dos pacientes.

No Japão, a toxocaríase em humanos adultos é associada à ingestão de vísceras cruas de animais domésticos, notadamente de frangos, bovinos e suínos (35), sendo os primeiros casos registrados em 1983.

Toxocaríase cerebral, acompanhada de hemiparesia dos membros inferiores, eosinofilia e elevação das taxas de IgE são descritos em paciente idoso por Hoffmeister et al.(36), na Alemanha. Anticorpos anti-*Toxocara* foram encontrados em soro e líquido cefalorraquidiano. A investigação epidemiológica excluiu as fontes mais comuns de infecção por *Toxocara*, levando à suspeita de que o consumo de fígado cru de pato, duas semanas antes do início dos sintomas, tenha sido a via de infecção.

Choi et al.(37), na Coréia do Sul, relatam que a presença de anticorpos anti-*Toxocara* foi mais frequente (87,5%) naqueles indivíduos com histórico de consumo de fígado bovino cru, em contraste com aqueles que não relataram este hábito (25,0%). Todos os pacientes investigados apresentavam eosinofilia. Em trabalho posterior (38), estes autores relatam que entre os 86 indivíduos positivos para anticorpos anti-*Toxocara*, 68 (79,1%) possuíam relato de ingestão recente de fígado bovino cru.

Yoshikawa et al. (39), no Japão, investigaram um surto familiar de toxocaríase em três adultos de uma mesma família. Todos possuíam o hábito de consumir semanalmente iscas cruas de fígado bovino, e apresentavam um quadro de eosinofilia acompanhada de pequenas lesões múltiplas em fígado e pulmões.

Noh et al. (40), na Coréia do Sul, reportam um caso de meningite eosinofílica em um indivíduo de 17 anos que apresentava cefaleia, febre, dispneia e anorexia. Pulmões e fígado também estavam alterados, e anticorpos anti-*Toxocara* foram encontrados no soro e líquido cefalorraquidiano. Os autores implicam o consumo de fígado cru de avestruz como provável fonte de infecção do indivíduo estudado.

Poucos levantamentos epidemiológicos em humanos consideram a associação da ingestão de alimentos de origem animal e toxocaríase visceral. No México, entretanto, Alvarado-Esquivel (41), ao avaliar catadores de lixo, incluiu o consumo de carne de suínos, bovinos, frangos e perus, bem como o consumo de embutidos e leite cru. Destas variáveis, no modelo inicial, apenas o consumo de leite caprino cru esteve associado à infecção pelo *Toxocara*, enquanto na análise multivariada houve uma associação negativa com o consumo de carne de frango, bem como com uma baixa frequência de consumo de alimentos fora de casa, sugerindo que a infecção por *Toxocara* não ocorra em restaurantes e outros locais fora dos domicílios.

Na Coreia, Yang et al. (42) relatam cinco casos de neuropatia óptica causada por *Toxocara*, associada a ingestão de produtos cárneos crus. Todos os pacientes eram do sexo masculino entre 30 e 60 anos de idade, apresentando edema do disco óptico, e em três foi possível verificar a presença de lesões granulomatosas na retina. Os cinco relatavam consumo de fígado bovino cru, e um deles, de fígado de coelho. Apenas um dos pacientes possuía cão na residência.

### **Infecção de animais de produção por *Toxocara***

Diversas espécies têm sido apontadas como hospedeiros paratênicos de *T. canis* e *T. cati*, entretanto a maior parte dos estudos é experimental e concentra-se em murinos (43). Desta forma, apesar da associação entre o consumo de produtos de origem animal e casos de toxocaríase humana, particularmente em países do oeste asiático, a extensão da infecção de animais de produção, e o risco de infecção humana a partir do consumo destes continua pouco estudado.

Na Dinamarca, Helwig et al. (44) determinaram o padrão de migração de *T. canis* em suínos infectados com 60.000 ovos. Aos sete dias após a infecção (DPI) larvas foram recuperadas dos linfonodos mesentéricos, fígado e pulmões. Aos 14 dias, as larvas eram encontradas principalmente nos pulmões, mas também no cérebro. Nenhuma larva foi encontrada nos olhos. Larvas foram recuperadas de musculatura como diafragma, masseter, língua e coração, mas em proporção sempre menor que 0,15 larvas para cada grama de tecido. Assim, apesar da intensa resposta humoral observada nos animais, que os fazem candidatos a modelos da infecção humana pelo parasito, os autores apontam baixo risco de infecção pelo consumo de produtos de origem suína.

Taira et al. (45), em trabalho experimental realizado na Dinamarca, concluem em direção oposta. Inoculando suínos com 50.000 ovos de *T. canis*, também encontraram mais frequentemente e em maior número, larvas do parasito no fígado e pulmões, com decréscimo da taxa de recuperação no decorrer do experimento. Neste caso determinaram a presença do parasito nos olhos de dois animais, e não houve evidência de imunidade protetora nos animais infectados, sendo encontradas novas larvas nos órgãos na reinoculação com 10.000 ovos. Com base nestes resultados os autores postulam que as reinfecções podem ser contínuas, e a chance de infecção humana pelo consumo de vísceras é possível.

A infecção de camundongos foi obtida a partir de infecção oral com fígado de sete leitões, que haviam sido previamente infectados oralmente com 50.000 ovos de *T. canis*, no trabalho desenvolvido por Sasmal et al. (46). A taxa de recuperação total de larvas foi de 4,97%, sendo mais frequente do fígado (3,05%) e menor (0,05%) em musculatura esquelética.

Na rotina de inspeção para *Trichinella spiralis* em um abatedouro na Noruega, Davidson et al (47) reportam o encontro de uma larva de *T. cati* em um pool de amostras de 100 animais. Não foi possível determinar de que propriedade a amostra era proveniente, entretanto todas as seis propriedades envolvidas possuíam gatos e infestações por roedores, evidenciando a potencial infecção de outros animais com o parasito.

Sommerfelt et al. (48), na Argentina, inocularam 12 suínos com 100.000 ovos de *T. cati*. Como no caso de *T. canis*, larvas foram recuperadas principalmente de fígado e principalmente pulmões. Na musculatura foram isoladas larvas aos 7, 14, 21 e 28 DPI, em taxas variando de 0,05 a 0,99 larvas por grama de tecido. O cérebro e os olhos também estavam parasitados, com 0,01 a 0,02 larvas por grama de tecido.

Aldawek et al. (49) e Revajová et al. (50), ambos na Eslováquia, em infecções experimentais de ovinos com 10.000 e 23.000 ovos de *T. canis*, respectivamente, determinaram que esta espécie pode atuar como um hospedeiro paratênico do parasito. O primeiro estudo determinou a presença do parasito principalmente em intestino delgado, fígado e pulmões, enquanto que o segundo determinou a resposta imune dos animais a infecções repetidas. Nesta espécie, diferente do encontrado para suínos (45), a reinfeção resultou em pronunciada resposta imune efetora contra o parasito.

Em Presidente Prudente, São Paulo, Santarém et al (51) investigaram a presença de anticorpos anti-*Toxocara* spp. em 365 ovinos de abatedouros e fazendas da região. Do total examinado, 183 (50,1%) foram positivos ao ELISA, com a frequência de animais positivos aumentando de acordo com a idade.

Raissier et al. (52) pesquisaram anticorpos anti-*Toxocara* spp. em 1.642 ovinos de 95 propriedades no Rio Grande do Sul; 29% dos animais apresentaram anticorpos séricos contra o parasito, e todas as propriedades apresentavam pelo menos um carneiro infectado. Entre as variáveis associadas à infecção, estavam o contato com cães não domiciliados ou canídeos selvagens, a presença de carcaças e o manejo extensivo.

Lee et al. (53), na Coréia do Sul, recuperaram larvas não identificadas de nematelmintos de 11,8% das 195 amostras de fígado bovino, em 6,4% das 109 amostras de fígado suíno e em nenhuma das 120 amostras de fígado de frangos examinadas. Além de pesquisar larvas no fígado de frangos, Lee et al. (53) também inocularam aves com aproximadamente 2.000 ovos de *T. canis*. As aves foram examinadas em período que variou de 1 dia a até 12 semanas pós-infecção. Dos pulmões, larvas foram recuperadas até uma semana após a infecção, e do cérebro apenas após duas semanas, e de forma intermitente. Independentemente do período, larvas foram recuperadas do fígado da maior parte das aves inoculadas, em número de oito a até 245 larvas, correspondendo a aproximadamente 0,4 a 12,3% de recuperação da dose infectante inicial.

Maruyama et al. (54) inocularam frangos com 1500 ovos embrionados de *T. canis*, e ensaiaram a recuperação de larvas dos tecidos entre um e 50 dias após a infecção (DPI). O número de larvas recuperadas variou de 40 até 192 das amostras de fígado, de oito a 166 na musculatura, não havendo recuperação de larvas do coração, baço e cérebro.

Taira et al. (55) estudaram a rota de migração do parasito em frangos inoculados com 5000, 10000 ou 50000 ovos, e abatidos para necropsia e recuperação de larvas no primeiro, terceiro e sexto DPI. Mais de 87% das larvas foram recuperadas de fígados e pulmões, com a porcentagem de recuperação variando de 0,4 a 16,7%. Os resultados reforçam a sugestão de que as aves podem ser reservatórios de infecção para o ser humano.

Taira et al. (56) recuperaram larvas de *T. canis* de suínos experimentalmente infectados com vísceras de frangos infectados. As larvas foram frequentemente recuperadas dos pulmões, mas também de linfonodos mesentéricos e fígado, e menos frequentemente do olho, cérebro e língua. A infecção dos suínos com vísceras mantidas refrigeradas por uma semana resultou em menor recuperação de larvas dos animais, entretanto, a infecção foi possível e consistente. Com isso, os autores reforçam a possibilidade de infecção, inclusive do ser humano, pelo consumo de pratos crus ou mal cozidos, preparados com órgãos e tecidos contaminados com larvas de *Toxocara*.

Azizi et al. (57) inocularam frangos com larvas de *T. cati*, recuperando o parasito mais frequentemente do fígado e cérebro das aves. Este achado experimental inclui esta espécie do

gênero na lista daquelas que podem infectar o ser humano pelo consumo de pratos preparados com tecidos contaminados.

Longevidade de até 240 dias para larvas de *T. cati* foi reportada por Oryan et al. (58) em aves experimentalmente infectadas, principalmente do cérebro destes animais, reforçando o potencial zoonótico destes animais como hospedeiros paratênicos do parasito.

A recuperação de larvas de *T. cati*, após longo período de infecção (176 dias), é relatada por Taira et al. (59) que encontraram larvas em 99,6% das amostras de músculo examinadas, das quais 52,9% mantinham-se infectantes para camundongos.

Taira et al. (60) demonstraram que, no tecido de frangos experimentalmente infectados, larvas de *T. cati* mantiveram a infectividade pelo menos até 28 dias, mesmo quando mantidas sob temperatura de 4°C por este período. O congelamento por 12, 24 ou 48 horas inviabilizou a recuperação de larvas do parasito dos camundongos inoculados com a carne das aves.

Os trabalhos experimentais permitem verificar alguns padrões recorrentes. As doses infectantes utilizadas variam de 1000 (57,58), 10.000 (55,60) e até 20.000 ovos larvados (55). Nestes casos é observado um efeito da dose infectante na taxa de recuperação de larvas dos tecidos das aves, relatado em Taira et al. (55), com maior recuperação de larvas em fígado aos seis DPI em comparação ao primeiro DPI; o encontro de mais larvas neste período pode ser explicado pelo tempo necessário para migração até o fígado. Já Dutra et al. (61) demonstram um padrão inverso na taxa de recuperação de larvas a partir da inoculação de camundongos pela via oral, com fígados de frangos experimentalmente infectados: da taxa de 0,84% na dose de 5000 ovos a 3,3% na dose de 300 ovos. A infecção das aves com baixas doses de ovos (< 100) pode inviabilizar a recuperação de larvas dos tecidos (61).

Outro padrão é que o tempo de exame dos tecidos pós-inoculação influencia na taxa de recuperação de larvas dos tecidos. Dos primeiros dias a até 14 DPI as taxas de recuperação tendem a ser mais elevadas. Lee et al. (53) recuperaram entre 0,4% a 12,3% de larvas; Taira et al. (55) entre 0,4% e 7,5%; Taira et al. (59) entre 7,4% a 10,0%; e Taira et al. (60), de 11,9%.

A recuperação das larvas também está associada ao tempo pós-infecção, ao tecido examinado e a espécie de *Toxocara* envolvida na infecção. No início da infecção, larvas de *Toxocara cati* são mais encontradas em fígado e pulmões e, após duas semanas, na musculatura (59). Entretanto, em um trabalho, há o registro da recuperação de larvas de *T. canis* do fígado de três meses a até 3 anos e meio pós-infecção das aves (43).

A conservação dos tecidos também influencia na taxa de recuperação. Taira et al. (60) relatam queda significativa da taxa de recuperação de larvas de musculatura das aves (de 11,9% para 5,5%) em tecidos armazenados por 28 dias (a 4°C); aos 14 dias a redução foi para 9,7%.

Além da tentativa de detecção de larvas de *Toxocara* em fígados de frangos, levada a termo por Lee et al. (53) e dos trabalhos experimentais nesta mesma linha, apenas recentemente a detecção de anticorpos séricos anti-*Toxocara* foi pesquisada nestas aves. Raposo (62) inoculou três grupos de 12 frangos com 100, 1000 e 5000 ovos larvados de *T. canis*, respectivamente, e fizeram coletas de sangue antes da inoculação e a partir do sétimo dia pós-inoculação, e então semanalmente até o 60º dia pós-inoculação. Pelo ELISA para antígenos excretórios-secretórios de *T. canis*, detectaram anticorpos séricos nas aves inoculadas a partir de 21 e 28 dias pós-inoculação, na dependência da dose infectante utilizada.

Como nos frangos, a infecção experimental de codornas (63,64) com ovos de *T. canis* também foi estabelecida. Apesar de ser recuperado de vários órgãos e tecidos, o parasito foi mais frequentemente isolado do fígado, e viável, pois foi capaz de provocar a infecção de 21,75% dos filhotes de cães alimentados com fígado das aves infectadas, estabelecendo estas aves como hospedeiro paratênico de *T. canis*.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção pelos parasitos do gênero *Toxocara* no ser humano são prevalentes em todo o mundo e particularmente nos países com menor grau de desenvolvimento. A prevalência é elevada também no Brasil, com mediana de 27% entre os 25 trabalhos revisados, mesmo considerando que alguns estudos pesquisaram extratos populacionais específicos, normalmente crianças em idade escolar. Estes parasitos podem induzir lesões graves nos hospedeiros, que se infectam normalmente pela ingestão de ovos presentes no ambiente. Há um acúmulo de registros de casos humanos relacionados à ingestão de larvas em produtos de origem animal, frequentemente quando consumidos crus, o que leva a uma concentração de relatos em países asiáticos onde existe este hábito. Particularmente no Brasil, o consumo de vísceras cruas não é comum. Ainda assim, o estudo da prevalência da infecção em animais de produção, notadamente os criados de forma extensiva, pode trazer informações importantes sobre a extensão da contaminação ambiental pelo parasito, contribuindo para o entendimento da epidemiologia desta zoonose negligenciada.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos à Adriana Lebram von Söhsten e ao CNPq pela concessão da bolsa de produtividade em pesquisa a Aristeu Vieira da Silva. À Dra. Guita Rubinsky-Elefant, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo pela revisão crítica do manuscrito.

## REFERÊNCIAS

1. Alum A, Rubino JR, Ijaz MK. The global war against intestinal parasites-should we use a holistic approach? *Int J Infect Dis.* 2010;14:e732-8.
2. Santarém VA, Rubinsky-Elefant G, Ferreira MU. Soil-transmitted helminthic zoonoses in humans and associated risk factors. In: Pascucci S. *Soil contamination.* New York: In Tech Open Science; 2011. p.3-66.
3. Hotez PJ, Wilkins PP. Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance? *Plos Negl Trop Dis.* 2009;3:e400.
4. Lee AC, Schantz PM, Kazacos KR, Montgomery SP, Bowman DD. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. *Trends Parasitol.* 2010;26:155-61.
5. Overgaauw PA, van Knapen F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol.* 2013;193:398-403.
6. Smith H, Holland C, Taylor M, Maqnaval JF, Schantz P, Maizels R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitol.* 2009;25:182-8.
7. Finsterer J, Auer H. Neurotoxocarosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49:279-87.
8. Santarém VA, Rubinsky-Elefant G, Chesine PAF, Leili FNC. Toxocaríases canina e humana. *Vet Zootec.* 1999;16:437-47.

9. Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH, Ferreira MU. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Annals Trop Med Parasitol*. 2010;104:3-23.
10. Fontoura PS. Soroprevalência, fatores associados e distribuição espacial de infecção por *Toxocara* spp. em crianças de Acrelândia, Acre, Amazônia Ocidental Brasileira [dissertação]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo; 2012.
11. Negri EC, Santarem VA, Rubinsky-Elefant G, Giuffrida R. Anti-*Toxocara* spp. antibodies in an adult healthy population: serosurvey and risk factors in Southeast Brazil. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3:211-6.
12. Chieffi PP, Ueda M, Camargo ED, de Souza AM, Guedes ML, Gerbi LJ, et al. Visceral larva migrans: a seroepidemiological survey in five municipalities of São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1990;32:204-10.
13. Anaruma Filho F, Chieffi PP, Correa CRS, Camargo ED, Silveira EPR, Aranha JJB. Human toxocariasis: incidence among residents in the outskirts of Campinas, State of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2002;45:293-4.
14. Ribeiro Júnior AGM. Epidemiologia das parasitoses intestinais e toxocaríase no município de Pedro de Toledo - SP [dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2002.
15. Alderete JMS, Jacob CM, Pastorinho AC, Rubinsky-Elefant G, Castro AP, Fomin AB, et al. Prevalence of *Toxocara* infection in schoolchildren from the Butantã region, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:593-7.
16. Kanamura HY, Araújo AJUS, Kanashiro EHY. Inquérito soropidemiológico para toxocaríase em zona rural do município de Taubaté, São Paulo, Brasil. *Rev Biocienc*. 2003;9:31-6.
17. Coelho LMPS, Silva MV, Dini Carlos Y, Giacon Neto AA, Novo NF, Silveira EPR. Human toxocariasis: a seroepidemiological survey in schoolchildren of Sorocaba, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:553-7.
18. Muradian V, Gennari SM, Glickman LT, Pinheiro SR. Epidemiological aspects of Visceral Larva Migrans in children living at São Remo Community, São Paulo (SP), Brazil. *Vet Parasitol*. 2005;134:93-7.
19. Ferreira UM, Rubinsky-Elefant G, de Castro TG, Hoffmann EH, da Silva-Nunes M, Cardoso MA, et al. Bottle feeding and exposure to *Toxocara* as risk factors for wheezing illness among under-five Amazonia children: a population-based cross-sectional study. *J Trop Pediatr*. 2007;53:119-24.
20. Paludo ML, Falavigna DL, Rubinsky-Elefant G, Baggio ML, Amadei LB, Falavigna-Guilherme AL. Frequency of *Toxocara* infection in children attended by the health public service of Maringá, south Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2007;49:343-8.

21. Santos GM, Silva AS, Barbosa AB, Campos DMB. Investigação soroepidemiológica sobre a larva migrans visceral por *Toxocara canis* em usuários de serviços de saúde de Goiânia - GO. *Rev Patol Trop*. 2009;38:197-206.
22. Colli CM, Rubinsky-Elefant G, Paludo ML, Falavigna DLM, Guilherme EV, Mattia S, et al. Serological, clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban areas of south Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2010;52:69-74.
23. Santarém VA, Leli FN, Rubinsky-Elefant G, Giuffrida R. Protective and risk factors for toxocariasis in children from two different social classes of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2011;53:67-72.
24. Souza RF, Dattoli VCC, Mendonça LR, Jesus JR, Baqueiro T, Santana CC, et al. Prevalência e fatores de risco da infecção humana por *Toxocara canis* em Salvador, Estado da Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44:516-9.
25. Manini MP, Marchioro AA, Colli CM, Nishi L, Falavigna-Guilherme AL. Association between contamination of public squares and seropositivity for *Toxocara* spp. in children. *Vet Parasitol*. 2012;188:48-52.
26. Mattia S, Colli CM, Adami CM, Guilherme GF, Nishi L, Rubinsky-Elefant G, et al. Seroprevalence of *Toxocara* infection in children and environmental contamination of urban areas in Paraná State, Brazil. *J Helminthol*. 2012;86:440-5.
27. Mendonça LR, Figueiredo CA, Esquivel R, Fiaccone RL, Pontes-de Carvalho L, Cooper L, et al. Seroprevalence and risk factors for *Toxocara* infection in children from an urban large setting in Northeast Brazil. *Acta Trop*. 2013;128:90-5.
28. Prestes-Carneiro LE, Rubinsky-Elefant G, Ferreira AW, Araujo PR, Troiani C, Zago SC et al. Seroprevalence of toxoplasmosis, toxocariasis and cysticercosis in a rural settlement, São Paulo State, Brazil. *Pathog Glob Health*. 2013;107:88-95.
29. Schoenardie ER, Scaini CJ, Brod CS, Pepe MS, Villela MM, McBride AJ et al. Seroprevalence of *Toxocara* infection in children from southern Brazil. *J Parasitol*. 2013;99:537-9.
30. Alcântara-Neves NM, de SG Britto G, Veiga RV, Figueiredo CA, Fiaccone RL, da Conceição JS, et al. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *BMC Res Notes*. 2014;7:817.
31. Cassenote AJF, Lima AR, Pinto Neto JM, Rubinsky-Elefant G. Seroprevalence and modifiable risk factors for *Toxocara* spp. in Brazilian schoolchildren. *Plos Negl Trop Dis*. 2014;8:e2830.
32. Lim JH. Foodborne eosinophilia due to visceral larva migrans: a disease abandoned. *J Korean Med Sci*. 2012;27:1-2.
33. Deutz A, Fuchs K, Auer H, Kerbi U, Aspöck H, Köfer J. *Toxocara*-infestations in Austria: a study on the risk of infection of farmers, slaughterhouse staff, hunters and veterinarians. *Parasitol Res*. 2005;97:390-4.

34. Morimatsu Y, Akao N, Akiyoshi H, Kawazu T, Okabe Y, Aizawa H. A familial case of visceral larva migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75:303-6.
35. Akao N, Ohta N. Toxocariasis in Japan. *Parasitol Int.* 2007;56:87-93.
36. Hoffmeister B, Glaeser S, Flick H, Pornschlegel S, Suttorp N, Bergmann F. Cerebral toxocariasis after consumption of raw duck liver. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76:600-2.
37. Choi D, Lim JH, Choi D-C, Paik SW, Kim S-H, Huh S. Toxocariasis and ingestion of raw cow liver in patients with eosinophilia. *Korean J Parasitol.* 2008;46:139-43.
38. Choi D, Lim JH, Choi D-C, Lee KS, Paik SW, Kim S-H, et al. Transmission of *Toxocara canis* via ingestion of raw cow liver: a cross-sectional study in healthy adults. *Korean J Parasitol.* 2012;50:23-7.
39. Yoshikawa M, Nishiofoku M, Moriya K, O uji Y, Ishizaka S, Kasahara K, et al. A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. *Parasitol Int.* 2008;57:525-9.
40. Noh Y, Hong ST, Yun JY, Park HK, Oh JH, Kim YE, et al. Meningitis by *Toxocara canis* after ingestion of raw ostrich liver. *J Korean Med Sci.* 2012;27:1105-8.
41. Alvarado-Esquivel C. Toxocariasis in waste pickers: a case control seroprevalence study. *Plos One.* 2013;8:e54897.
42. Yang HK, Woo SJ, Hwang JM. *Toxocara* optic neuropathy after ingestion of raw meat products. *Optom Vis Sci.* 2014;91:e267-e73.
43. Strube C, Heuer L, Janecek E. *Toxocara* infection in paratenic hosts. *Vet Parasitol.* 2013;193:375-89.
44. Helwigh AB, Lind P, Nansen P. Visceral larva migrans: migratory pattern of *Toxocara canis* in pigs. *Int J Parasitol.* 1999;29:559-65.
45. Taira K, Saeed I, Lind P, Murrell KD, Kapel CM. Population dynamics of *Toxocara canis* in pigs receiving a single or multiple infection. *Parasitology.* 2003;127:593-602.
46. Sasmal NK, Acharya S, Laha R. Larval migration of *Toxocara canis* in piglets and transfer of larvae from infected porcine tissue to mice. *J Helminthol.* 2008;82:245-9.
47. Davidson RK, Mermer A, Oines O. *Toxocara cati* larva migrans in domestic pigs - detected at slaughterhouse control in Norway. *Acta Vet Scand.* 2012;54:66.
48. Sommerfelt IE, Duchene A, Daprato B, Lopez CM, Cardillo N, Franco AJ. Experimental infection with *Toxocara cati* in pigs: migratory pattern and pathological response in early phase. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2014;56:347-52.
49. Aldawek AM, Levkut M, Revajová V, Kolodzieyski L, Seveiková Z, Dubinsky P. Larval toxocariosis in sheep: the immunohistochemical characterization of lesions in some affected organs. *Vet Parasitol.* 2002;105:207-14.

50. Revajová V, Levkut M, Aldawek AM, Herich R, Dvorožnáková E, Krupicer I. Immunological changes after multiple *Toxocara canis* infection in lambs. *Helminthologia*. 2006;43:69-75.
51. Santarém VA, Chesine PA, Lamers BE, Rubinsky-Elefant G, Giuffrida R. Anti-*Toxocara* spp. antibodies in sheep from southeastern Brazil. *Vet Parasitol*. 2011;179:283-6.
52. Rassier GL, Borsuk S, Pappen F, Scaini CJ, Gallina T, Villela MM, et al. *Toxocara* spp. Seroprevalence in sheep from southern Brazil. *Parasitol Res*. 2013;112:3181-6.
53. Lee KT, Min HK, Chung PR, Chang JK. Studies on the inducing possibility of human visceral larva migrans associated with eating habit of raw liver of domestic animals . *Kisaengchunghak Chapchi*. 1976;14:51-60.
54. Maruyama S, Nino T, Yamamoto K, Katsube Y. Parasitism of *Toxocara canis* larvae in chickens inoculated with the ascarid eggs. *J Vet Med Sci*. 1994;56:139-41.
55. Taira K, Permin A, Kapel CM. Establishment and migration pattern of *Toxocara canis* larvae in chickens. *Parasitol Res*. 2003;90:521-3.
56. Taira K, Saeed I, Permin A, Kapel CM. Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. *Vet Parasitol*. 2004;121:115-24.
57. Azizi S, Oryan A, Sadjjadi SM, Zibaei M. Histopathologic changes and larval recovery of *Toxocara cati* in experimentally infected chickens. *Parasitol Res*. 2007;102:47-52.
58. Oryan A, Sadjjadi SM, Azizi S. Longevity of *Toxocara cati* larvae and pathology in tissues of experimentally infected chickens. *Korean J Parasitol*. 2010;48:79-80.
59. Taira K, Saitoh Y, Kapel CM. *Toxocara cati* larvae persist and retain high infectivity in muscles of experimentally infected chickens. *Vet Parasitol*. 2011;180:287-91.
60. Taira K, Saitoh Y, Okada N, Sugiyama H, Kapel CM. Tolerance to low temperatures of *Toxocara cati* larvae in chicken muscle tissue. *Vet Parasitol*. 2012;189:383-6.
61. Dutra GF, Pinto NS, de Avilla LF, Dutra PC, Telmo P de L, Rodrigues LH, et al. Risk of infection by the consumption of liver of chickens inoculated with low doses of *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol*. 2014;203:87-90.
62. Raposo RS. Infecção experimental de frangos com *Toxocara canis*: cinética e avidéz de anticorpos IgY [dissertação]. Presidente Prudente: Universidade do Oeste Paulista; 2014.
63. Pahari TK, Sasmal NK. Experimental infection of japanese quail with *Toxocara canis* larvae throught earthworms. *Vet Parasitol*. 1991;39:337-40.
64. Pahari TK, Sasmal NK. Infection of japanese quail with *Toxocara canis* larvae and establishment of patent infection in pups. *Vet Parasitol*. 1990;35:357-64.

**Recebido em: 18/03/2015**

**Aceito em: 25/06/2015**

## ESTUDO DA MATURIDADE FETAL CANINA EM FASE FINAL DE GESTAÇÃO: APLICABILIDADE DIAGNÓSTICA

Fernanda Gonçalves Canello<sup>1</sup>  
Vívian Tavares Almeida<sup>1</sup>  
Aline Eyko Kawanami<sup>1</sup>  
Guadalupe Sampaio Ferreira<sup>1</sup>  
Mariana Dulce Delle Vedove Ortolan<sup>1</sup>  
Maria Emília Franco Oliveira<sup>1</sup>  
Marcus Antonio Rossi Feliciano<sup>2</sup>  
Wilter Ricardo Russiano Vicente<sup>3</sup>

### RESUMO

Em medicina, técnicas para avaliar maturidade óssea, pulmonar, renal e cardíaca são rotineiramente utilizadas em obstetrícia, diferentemente da veterinária em que essas avaliações estão sendo recentemente estudadas. A avaliação dos fluidos fetais torna-se para a obstetrícia humana um parâmetro de determinação da maturidade fetal, gestação de alto risco, morte fetal, infecção e sexo fetais. Considerando que para pequenos animais faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas para determinação da maturação fetal dos conceptos, a presente revisão tem como objetivo descrever a aplicação de métodos diagnósticos para avaliação da maturidade fetal em pequenos animais.

**Palavras-chave:** caninos, maturidade fetal.

## STUDY OF CANINE FETAL MATURITY, EMPHASIZING FINAL STAGE OF GESTATION, AND DIAGNOSTIC APPLICABILITY

### ABSTRACT

In medicine, techniques for assessing skeletal maturity, lung, kidney and heart are already routinely used in obstetrics, unlike veterinary that these assessments are being studied recently. The assessment of fetal fluids becomes for obstetrics human a parameter for determining fetal maturity, high-risk pregnancy, fetal death, fetal infection and sex. Whereas for small animals it is necessary to develop techniques applicable to determine the fetal maturation of fetuses, this paper aims to review or describe the application of these methods and assessment of fetal maturity in small animals.

**Keywords:** canines, fetal maturity.

## ESTUDIO DE LA MADUREZ FETAL CANINA AL FINAL DEL EMBARAZO: APLICABILIDAD DE DIAGNÓSTICO

### RESUMEN

En la medicina, las técnicas para la evaluación de la madurez esquelética, pulmón, riñón y corazón ya se usan de forma rutinaria en obstetricia, a diferencia de veterinaria que estas evaluaciones están siendo estudiados recientemente. La evaluación de los fluidos fetales se

<sup>1</sup> Pós-Graduanda UNESP/Jaboticabal

<sup>2</sup> Pós-Doutorando do Departamento de Reprodução Animal. Contato principal para correspondência.

<sup>3</sup> Prof. Titular do Departamento de Reprodução Animal, UNESP/Jaboticabal

convierte en obstetricia humana para un parámetro para la determinación de la madurez fetal, embarazo de alto riesgo, muerte fetal, infección fetal y el sexo. Mientras que para los pequeños animales es necesario desarrollar técnicas aplicables para determinar la maduración fetal, el presente trabajo tiene como objetivo revisar o describir la aplicación de estos métodos y la evaluación de la madurez fetal en animales pequeños.

**Palabras clave:** caninos, la madurez fetal.

## INTRODUÇÃO

O termo maturidade fetal (*lat maturitate*) é definido como um estado de completo desenvolvimento, perfeição e excelência (1), ou seja, um feto maduro é aquele que passou por um desenvolvimento tal que já se encontra apto a sobreviver fora do ambiente materno.

Em veterinária, os principais sinais de maturidade observados nos carnívoros domésticos são extrauterinos, como por exemplo, a presença de pelos curtos e densos por todo o corpo do neonato, peso ao redor de 80 a 300 gramas e pálpebras ainda cerradas (2). Contudo, o diagnóstico intrauterino da maturação fetal é essencial na tentativa de instituir meios para detecção de intercorrências durante a gestação em pequenos animais, estabelecendo terapias pré-natais que aumentem as chances de sobrevivência materno-fetal (3). Em cadelas e gatas há ainda um agravante: o período de gestação, ou seja, intervalo desde o acasalamento fértil até o parto (4) de aproximadamente 60 dias (5), torna curto o tempo disponível para a maturação dos órgãos fetais, quanto mais para avaliação da mesma.

Técnicas para avaliação da maturidade óssea, pulmonar, renal e cardíaca estão sendo desenvolvidas em obstetrícia veterinária (6, 7, 8), mesmo que restritas à aplicação acadêmica. Considerando a importância do tema em questão, essa revisão tem como objetivo descrever a aplicação de métodos diagnósticos para avaliação da maturidade fetal em pequenos animais.

## TÉCNICAS DE IMAGEM

O diagnóstico gestacional em cadelas contribui para aumentar a eficiência reprodutiva dos animais, de modo a adequar precocemente o manejo às novas necessidades da fêmea gestante (9). Ademais, o acompanhamento desta gestação permite avaliar a viabilidade dos fetos, seja por meio da avaliação do bem-estar fetal (exemplo: averiguar a normalidade do número batimentos cardíacos dos conceitos em relação à mães/frequência cardíaca fetal cerca de duas a três vezes maior que a materna), estimar o número de filhotes, bem como a idade gestacional, e acompanhar a maturação e desenvolvimento fetais (10).

Neste contexto, o exame ultrassonográfico, além de seguro à fêmea e aos fetos, mostra-se eficaz e preciso na avaliação da gestação em cadelas. Além de confirmar a prenhez, estimar a idade gestacional, avaliar as condições do útero e fetos, também é possível diagnosticar anormalidades gestacionais, como mau desenvolvimento do conceito, reabsorção e abortamento (11). Ato contínuo, ao considerar a evolução e desenvolvimento da gestação, por meio da visibilização das estruturas fetais em diferentes períodos (5), é possível estimar se o feto apresenta-se maduro ou não.

É possível estimar a maturação fetal por meio da organogênese durante toda a gestação, através do aparecimento dos membros, encéfalo, calcificação e vísceras como o fígado, coração rins, intestinos, estomago, vesícula urinaria (12, 13).

Os transdutores de alta frequência são úteis e precisos quando o assunto é precocidade de avaliação, pois permitem a obtenção de parâmetros métricos mais precisos, para serem utilizados em equações para a predição da idade fetal (11).

A partir dos 16 dias da gestação em cadelas (14) pode-se observar movimento das fibras cardíacas e a presença do embrião como uma estrutura hiperecótica presente dentro da vesícula

gestacional utilizando transdutor de alta frequência de 12 MHz. Com aproximadamente 30 dias (15), utilizando transdutores de 7,5 MHz, identificou-se movimento fetal e presença de conteúdo anaecóico no estômago do feto aos 33 dias. A partir dos 34 e 36 dias observou-se o pulmão mais ecogênico, contrastando com o fígado hipoecóico. Em estudo (16), foi possível visualizar os rins em fetos de cadelas schnauzer miniatura aos 42 dias utilizando também, transdutores de 7,5 MHz.

A utilização de frequências superiores a 10 Mhz, demonstram que o aumento da frequência imprime precocidade na visualização das vesículas gestacionais, entretanto, a partir do 35º dia de gestação não há maior sensibilidade na visualização das estruturas fetais e extra-fetais (17).

O exame radiográfico é comumente utilizado no período final da gestação de cadelas, quando já houve mineralização óssea fetal, sendo obtidas imagens por volta de 42 dias de gestação. Em seguida, tornam-se visíveis os ossos dos membros dianteiros, traseiros, pelve, costelas e finalmente os dentes (18).

## ESTUDO DOS FLUIDOS FETAIS

Os termos “alantóide” e “âmnion”, ambos de origem grega, designam a membrana que reveste o embrião (2). O líquido amniótico, por envolver completamente o embrião, protege-o contra choques externos, evita aderências da membrana amniótica ao concepto e desidratação do mesmo, permite o crescimento e a movimentação fetal, além de lubrificar o canal do parto, facilitando a passagem do feto. Em contrapartida, o líquido alantoidiano colabora na manutenção da pressão osmótica do plasma fetal, armazena os produtos da excreção do feto e auxilia a adoção da posição eutócica próximo ao parto (4, 5, 2).

Em carnívoros, o líquido amniótico assume coloração esbranquiçada, aspecto translúcido e consistência viscosa, variando de 8 a 30 ml. O líquido alantoidiano, com 10 a 50 ml, possui cor amarelo-escuro a esverdeado, sendo transparente e aquoso (2).

Os líquidos fetais exercem papel fundamental no desenvolvimento dos sistemas musculoesquelético, gastrointestinal e respiratório fetal (4). Por conseguinte, a análise destes fluidos (composição e volume) permite não apenas o acompanhamento da gestação, mas também a avaliação do estado de maturação fetal.

Em Medicina, a avaliação dos fluidos fetais é utilizada como parâmetro para determinação da maturidade fetal, gestação de alto risco, morte fetal, infecção e sexagem fetais (19), com real e rotineira aplicação clínica. Já o desenvolvimento de técnicas com tal objetivo encontra certas limitações em veterinária, como a inviabilidade e/ou dificuldade de realização em determinadas espécies múltiparas.

Até o final da década de 60, o acompanhamento da gestação em humanos era baseado quase que exclusivamente em técnicas de controle, tanto da viabilidade quanto da maturação fetal (última menstruação, movimentos fetais, escuta fetal e altura uterina eram os parâmetros de análise). Com o desenvolvimento de uma tecnologia precisa e específica, inúmeras técnicas surgiram permitindo hoje a avaliação minuciosa do desenvolvimento do feto, passo a passo, como, por exemplo, a ultrassonografia, dopplervelocimetria, cardiotocografia, cardiocentese, ecocardiografia, ressonância magnética, amniocentese e amnioscopia (20), sendo as duas últimas o estudo dos fluidos fetais (Tabela 1).



Tabela 1. Técnicas de diagnóstico e condições clínicas associadas para estudo da maturidade fetal em medicina (20).

<b>Técnicas de Diagnóstico</b>	<b>Condição Clínica</b>
Ultrassonografia	Desenvolvimento Somático
Ultrassonografia/Ressonância Magnética	Malformações fetais
Amniocentese/Ultrassonografia/Sangue Materno	Sexo fetal
Amniocentese/Biópsia de Vilo Corial	Alterações genéticas e metabólicas
Amniocentese/Ultrassonografia	Maturação Pulmonar
Amniocentese (concentração de surfactantes)	Maturação Renal
Amniocentese (volume e concentração de eletrólitos)	Maturação Placentária
Amniocentese (presença de células e secreções)	Maturação da Pele

É notório que diversas e importantes informações provem da investigação dos fluidos fetais em humanos, como por exemplo, o aspecto do líquido amniótico, sua coloração, presença de partículas em suspensão (grumos), transparência e volume, favorecendo a avaliação da maturação fetal e condição clínica do concepto (19).

Exemplificando a importância dessas avaliações, alterações na coloração do líquido amniótico humano podem evidenciar: líquido amarelado presume enfermidade hemolítica, com acúmulo de bilirrubina (isoimunização pelo fator Rh); se amarelo esverdeado, denuncia a presença de mecônio e risco de infecção fetal; cor verde, clara ou escura, relaciona-se à presença progressiva de mecônio e está ligada a sofrimento fetal; coloração vermelha sugere morte do feto, evoluindo para marrom achocolatado em caso de maceração (21).

Da mesma forma que a coloração, os volumes anormais de líquido amniótico evidenciam problemas gestacionais. Em mulheres, o volume máximo deste líquido é alcançado na 34<sup>a</sup> semana de gestação, decaindo até o momento do parto devido à maturação do sistema tubular fetal (22). O oligodidrânio, diminuição do volume para valores inferiores a 400 ml entre 21 e 42 semanas de gestação em mulheres, associa-se à má formação do sistema urinário fetal. Em contrapartida, distúrbios genéticos, infecções, má formação fetal e obstrução digestiva cursam com o polididrânio, ou seja, aumento do volume para valor superior a 2000 ml (23; 24).

Em estudo dos líquidos fetais em cadelas gestantes aos 30 e 40 dias de gestação e no momento da cesariana, verificou-se a presença de células imaturas, medianamente maduras, maduras e hiper maduras anucleadas (escamas), sendo que a concentração de escamas superior a 90% foi relacionada a fetos em estágio de pós-maturidade (3).

Cabe salientar que são poucos os estudos sobre os fluidos fetais em cães durante o processo gestacional, principalmente devido à disposição anatômica das membranas fetais e sua fragilidade (25). Faz-se então necessário o aprimoramento de técnicas que viabilizem uma investigação precisa destes líquidos, uma vez que refletem a viabilidade e a maturidade do feto.

## **MATURIDADE CARDIOVASCULAR FETAL**

O estudo do sistema cardiovascular dos fetos caninos inicia-se a partir do 32º dia gestacional com a visualização dos batimentos cardíacos fetais, por meio da ultrassonografia. Em seguida, no 46º dia de gestação, é possível detectar as câmaras e valvas cardíacas (26,27). Porém, somente a ultrassonografia bidimensional não permite avaliar as características hemodinâmicas vasculares, sendo necessário o emprego do Doppler o que permite uma avaliação em tempo real das hemodinâmicas materna e fetal de vasos, tais como artéria uteroplacentária, cordão umbilical, aorta e veia cava caudal do feto. O crescimento fetal

adequado exige uma perfusão sanguínea normal garantindo o aporte de nutrientes para o feto (28,29).

De modo geral, no início da gestação há simultaneamente altos valores de índice de resistência (RI) e índice de pulsatividade (PI) e ausência de fluxo diastólico nas artérias aorta e umbilical, índices vasculares importantes avaliados por meio do Doppler gestacional em cadelas. De acordo com o desenvolvimento da circulação fetal, aliado ao aparecimento de um pico diastólico nessas artérias, os valores de RI e PI da artéria umbilical e RI da artéria aorta diminuem progressivamente até o final da gestação (8).

## **MATURIDADE RENAL FETAL**

A função renal fetal durante o período de gestação ocorre por meio de mudanças sucessivas, tanto fisiológicas como morfológicas. O conhecimento deste processo é importante uma vez que a urina, durante a última metade da gestação, é a principal fonte de líquido amniótico (30).

A composição do líquido amniótico (eletrólitos, proteínas e equilíbrio ácido-base) muda rapidamente, o que leva a hipótese que estas alterações reflitam no desenvolvimento e maturação dos órgãos fetais, em particular, nas atividades metabólicas do rim, pulmões e trato digestivo (31).

O desenvolvimento dos néfrons em rins fetais inicia-se com as mudanças que ocorrem no metanéfron e progride até a formação do rim definitivo, o qual começa a produzir urina. Estas mudanças refletem em aumento da diferenciação fetal e na composição do fluido amniótico (31). A mudança secundária da maturação renal é justamente o aparecimento da filtração glomerular fetal, mesmo quando a função tubular ainda se encontra imatura (32).

Alfafetoproteína (AFP) é uma glicoproteína sintetizada pelo saco gestacional, trato gastrointestinal e fígado fetal (33). Sua função ainda é desconhecida, no entanto, supõem-se ser importante na prevenção da rejeição do feto pela mãe (34). AFP passa para o líquido amniótico por meio da urina do feto e em níveis elevados pode ser indicativo de defeito no tubo neural, defeitos de pele, trato urinário, placenta e trato gastrointestinal (35).

Outro elemento bioquímico a ser considerado de grande importância é a creatinina, por ser utilizada também para determinar a maturidade fetal em diferentes espécies (36). Uma grande concentração de urina no líquido amniótico está associada diretamente ao aumento na taxa de filtração glomerular, maturação do rim fetal e da massa muscular do feto (30).

Embora imaturo, o rim fetal, durante seu período de formação contribui para a sobrevivência do concepto durante seu crescimento (3) e também pode ser avaliado funcionalmente pela determinação de microglobulinas vesicais, sendo confirmada pela presença de microglobulinas no fluido amniótico (37). No decorrer da gestação, as células do túbulo proximal elevam sua capacidade de absorção, favorecendo a transferência destas proteínas para o ambiente amniótico. Logo, o aumento da filtração glomerular pode ser entendido como um indicativo de maturidade renal definida pela avaliação da maturidade das células tubulares mediante o transporte de diversas moléculas (14).

## **MATURIDADE PULMONAR FETAL**

O desenvolvimento do aparelho respiratório fetal é um fenômeno complexo e contínuo, que engloba o crescimento e maturação pulmonar. Inicia-se na fase precoce da gestação e estende-se até a vida adulta, podendo ser dividida em três períodos cronológicos: embrionário, fetal e pós-natal (38).

O sucesso no processo de adaptação imediata à vida extrauterina depende essencialmente da presença de uma função pulmonar adequada, incluindo a maturação morfológica, fisiológica e bioquímica do parênquima pulmonar (39). Ao final da gestação

é possível inflar os pulmões fetais com ar, porém ao cessar a pressão positiva administrada, os alvéolos colabam rapidamente (40). O surfactante (lipoproteína tensoativa secretada dentro dos alvéolos pela membrana alveolar) tem fundamental importância por se interdigitar entre as moléculas de água da fase aquosa do filme superficial alveolar e reduzir suas propriedades de coesão, diminuindo a tensão superficial, sendo que desta maneira, o surfactante estabiliza os alvéolos e garante que eles permaneçam de tamanho uniforme (38).

Para adaptação do neonato à vida extrauterina é essencial que haja uma quantidade adequada de surfactantes, para revestir os espaços aéreos dos pulmões (41). Essas substâncias são produzidas e estocadas nos pneumócitos tipo II (42).

Em medicina humana, a maturidade fetal pulmonar é avaliada pelo fluido amniótico utilizando amniocentese. Conforme o pulmão se desenvolve, quantidades significativas de surfactante são eliminadas para fora dos pulmões do feto e se acumulam no líquido amniótico (43). Os testes de maturidade pulmonar podem ser divididos didaticamente em dois grupos: os testes que dosam a presença do material surfactante no líquido amniótico e aqueles que testam a função surfactante presente nesse líquido (44).

Entre os testes incluem-se, entre outros, a relação lecitina/esfingomielina (L/E), teste de Clements, a dosagem da fosfatidilcolina saturada, do fosfatidilglicerol, perfil dos fosfolípidios, dosagem das proteínas específicas do surfactante e contagem dos corpos lamelares. Já os testes de função surfactante baseiam-se na capacidade dessa substância de diminuir a tensão superficial nos líquidos provenientes das vias aéreas (45).

A aplicabilidade de tais testes em veterinária ainda é recente, sendo na maioria das vezes utilizados em pesquisa. O teste de Clements “modificado” é utilizado para avaliação de amostras de líquidos fetais na espécie canina e obtiveram resultados confiáveis e indicativos de maturidade fetal pulmonar em cães (7).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O exame ultrassonográfico atualmente tem grande utilidade na rotina veterinária de pequenos animais no que diz respeito à gestação. A ultrassonografia permite um diagnóstico gestacional preciso, assim como realizar monitoração da cadela prenhe, avaliação da viabilidade fetal e detecção de possíveis anormalidades da gestação e dos fetos.

A determinação pré-natal da maturidade fetal é importante, principalmente, nos casos de gestação de alto risco, quando a idade gestacional não é conhecida, em casos de cesarianas. Quando existem riscos tanto à saúde do concepto quanto a saúde materna, a precocidade no reconhecimento da viabilidade ou inviabilidade do feto aumenta a probabilidade de uma intervenção rápida.

## REFERÊNCIAS

1. Michaelis: moderno dicionário da língua portuguesa. São Paulo: Companhia Melhoramentos, 1998-(Dicionários Michaelis). 2259p.
2. Toniollo GH, Vicente WRR. Manual de Obstetrícia Veterinária. São Paulo: Varela, 2003.
3. Barreto CS. Avaliação bioquímica, citológica e do perfil eletroforético de proteínas no líquido amniótico e alantoideano de cadelas entre 30-40 dias da gestação e no momento do parto. [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2002.
4. Hafez ESSE, Hafez B. Reprodução Animal. Barueri: Manole; 2004.

5. Prestes NC, Landim-Alvarenga FC. *Obstetrícia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koog; 2012.
6. Barreto CS, Prestes NC, Souza FF, Santos RV, Matayoshi PM, De Vita B, Leal LS. Concentração proteica nos fluidos fetais como método indicador da maturidade renal de fetos caninos. *Vet. e Zootec*. 2012;19(1): 337-345.
7. Barreto CS, Prestes NC, Souza FF, Santos RV, Matayoshi PM, De Vita B, Leal LS. Uso do teste de Clements modificado e densidade óptica do líquido amniótico e alantoidiano para avaliação da maturidade pulmonar em cães. *Vet. e Zootec*. 2011; 18(1):63-69.
8. Silva LDM, Barbosa CC, Pereira BS. O uso da ultrassonografia Doppler na reprodução de cadelas e gatas. *Rev Bras Reprod Anim*. 2011; 35(2):198-201.
9. Freitas JG, Silva AR. Diagnóstico de gestação em cadelas. *Rev. Bras. Reprod. Anim*. 2008; 32(1):58-66.
10. Jackson PGG. *Obstetrícia veterinária*. São Paulo: Roca, 2006.
11. Feliciano MAR, Vicente WRR, Leite CAL, Muzzi LAL. Novas perspectivas no diagnóstico ultra-sonográfico gestacional em cadelas – revisão de literatura. *Clín. Veterin*. 2008; 73:56-60.
12. Aissi A, Alloui N, Slimani C, Touri S. Preliminary study of the early ultrasonic diagnosis of pregnancy and fetal development in the dog. *J Anim Vet Adv*. 2008; 7(5): 607-611.
13. Davidson AP, Baker TW. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Top Companion Anim M*. 2009; 4(2):55- 63.
14. Ferrari M. Ultrassonografia de alta frequência para avaliação do desenvolvimento gestacional e da fetometria em cadelas. [Dissertação]. Goiânia: Programa de Pós graduação em Ciência Animal- UFG, Medicina Veterinária; 2009.
15. Aissi A, Slimani S. Ultrasonographic appearance of gestational structures throughout pregnancy in bitches. *Am J Anim Vet Sci*. 2008; 3(1):32-35.
16. Kim B S, Son C H. Time of initial detection of fetal and extra fetal structures by ultrasonographic examination in miniature schnauzer bitches. *J Vet Sci*. 2007; 8(3):289-293.
17. Burk RL, Feeney DA. *Small Animal Radiology and ultrasonography: A diagnostic Atlas and Text*, St Louis: Elsevier Inc.; 2003.
18. Concannon PW, Yeager AE. Ultrasonographic, radiographic and clinical changes during pregnancy parturition and lactate on in dogs. In: *Annual Meeting of Society for Theriogenology*. San Diego; 1990. p. 197-223.
19. Rezende J. *Obstetrícia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
20. Neme B. *Obstetrícia Básica*. São Paulo: Sarvier; 2006.

21. Benzecry RM. Amnioscopia. [Livre Docência]. Rio de Janeiro: Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, p. 1-30, 1970.
22. Costa MGF, Costa Filho CFF, Dias MC, Freitas ACS. Ferramenta de Auxílio ao Diagnóstico Médico Durante a Gravidez. In: Memórias II Congresso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica; 2001, Havana, Cuba; 2004, p. 1-5.
23. Mauad Filho F. Manual e Coletânea de Tabelas em Ultra-Sonografia. Ribeirão Preto: Scala, 1997.
24. Reece A, Hobbins J, Mahoney M & Petrie R. Compêndio de Medicina Fetal e Materna. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.
25. Christiansen J. Reprodução no cão e no gato. São Paulo: Manole, 1988.
26. Burk RL, Ackerman N. The abdomen. In: Small animal radiology and ultrasonography: a diagnostic atlas and text. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p.215-426,
27. Feliciano MAR, Muzzi LAL, Leite CAL, Junqueira MA. Ultrassonografia bidimensional convencional, de alta resolução e tridimensional no acompanhamento da gestação em cadela. Arq Bras Med Vet Zootec. 2007; 59:1333-1337.
28. Di Salvo P, Bocci F, Zelli R, Polisca A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. Vet Sci. 2006; 81:382-388.
29. Baschat AA, Gembruch U, Reiss I, Gortner LCP, Weiner P, Harman CR. Relationship between arterial and venous Doppler and perinatal outcome in fetal growth restriction. Ultrasound Obst Gyn. 2000; 16:407-413.
30. Oliveira FR. Líquido amniótico: Perfil bioquímico do desenvolvimento renal e fetal. [Dissertação]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica. 2001.
31. Gulbis B, Gervy C, Jauniaux E. Amniotic fluid biochemistry in second-trimester trisomic pregnancies: relationships to fetal organ maturation and dysfunction. Early Hum Dev. 1998; 52:211-219.
32. Muller F, Oury J, Boue J, Boue A. Microvillar enzyme assay in amniotic fluid and fetal tissues at different stages of development. Prenat Diagn. 1988; 8:19-198.
33. Daffos F, Forestier F. Les Malformations du Système Nerveux Central. In: Daffos F, Forestier F eds. Médecine et Biologie du Foetus Humain, Paris: Maloine, 1988. p. 260-291.
34. Milunsky A. Maternal Serum Screening for Neural Tube and Other Defects. In Milunsky A ed. Fetus: Diagnosis, prevention and treatment. 3rd ed. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 1992. p. 507-63.
35. Maestri D, Sanseverino MTV, Cheinquer N, Correa MCM, Kessler RG, De Azevedo Magalhães JA. Alfafetoproteína: valores normais no líquido amniótico entre 14 e 21 semanas. Rev Ass Med Brasil. 1998; 44(4):273-276.

36. Zogno MA, Miglino MA, Oliveira MF. Análise bioquímica dos líquidos fetais e citologia do fluido amniótico da fêmea de Mocó (*Kerodon rupestris*). *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2004; 41:228-235.
37. Lumbers ER, Smith FG, Stevens AD. Measurement of net transplacental transfer of fluid to the fetal sheep. *J Physiol*. 1985; 364:289-99.
38. Kopelman, BI; Miyoshi, MH; Guinsburg, R. Distúrbios respiratórios no período neonatal. São Paulo: Atheneu, 1998.
39. Cuello, AF; Aquim, EE; Masciantonio, L. Terapêutica funcional respiratória del recién nacido. Buenos Aires: Intermédica, 1993.
40. Vestweber, JG. Respiratory problems of newborn calves. *V Vet Clin N Am-Food A*. 1997; 13(3):411-424.
41. Díaz, RAC; Millo, JAM; Domínguez, NC. Evaluación del surfacén em el síndrome de dificultad repsiratoria del prematuro. *Rev Cubana Pediatr*. 2000; 72:287-294.
42. Rebello, CM; Proença, RSM; Troster, EJ; Jobe, AH. Terapia com surfactante pulmonar exógeno: o que é estabelecido e o que necessitamos determinar. *J Pediatr*. 2002; 78:215-226,
43. Field, NT; Gilbert, WM. Current status of amniotic fluid tests of fetal maturity. *Clin Obstet Gynecol*. 1997;40:366–386.
44. Luz, JH. Teste das microbolhas estáveis na avaliação da função surfatante in vitro [dissertação]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2001.
45. Vieira, ACG. Contagem de corpos lamelares na secreção traqueal de recém-nascidos para avaliação da maturidade pulmonar [tese]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2010.

**Recebido em: 08/10/2013**

**Aceito em: 29/06/2015**

## AVALIAÇÃO DOS PADRÕES DE VITALIDADE DO NEONATO EQUINO – REVISÃO DE LITERATURA

Raíssa Karolliny Salgueiro Cruz<sup>1</sup>  
Angélica Alfonso<sup>2</sup>  
Maria Lúcia Gomes Lourenço<sup>3</sup>  
Simone Biagio Chiacchio<sup>4</sup>

### RESUMO

O período neonatal caracteriza-se por uma fase de adaptação fisiológica e metabólica, onde os sistemas orgânicos precisam atender aos novos desafios da vida extrauterina. O conhecimento da fisiologia, a avaliação do vigor do neonato e uma rápida intervenção, no que diz respeito à reanimação, são essenciais para a diminuição da mortalidade neonatal. A presente revisão de literatura tem por objetivo discorrer sobre alguns dos principais métodos de avaliação da vitalidade do neonato equino, considerando-se o escore de Apgar, hemogasometria, metabolismo da glicose e lactato e eletrocardiografia como os principais procedimentos, além de ressaltar os resultados dos estudos que utilizaram esses métodos de avaliação.

**Palavras-chave:** potros, escore de Apgar, hemogasometria, lactato, eletrocardiograma.

### EVALUATION OF PATTERNS OF VITALITY OF EQUINE NEONATE - REVIEW OF THE LITERATURE

#### ABSTRACT

The neonatal period is characterized by a phase of physiological and metabolic adaptation, where organic systems need to meet the new challenges of extrauterine life. Knowledge of physiology, the vigor of infant and early intervention, with regard to resuscitation, are essential to reducing neonatal mortality. This literature review aims to discuss some of the main methods of assessing the vitality of the equine neonate, considering the Apgar score, blood gas analysis, glucose and lactate metabolism and electrocardiography as the main procedures and highlights the results of studies that used these methods.

**Keywords:** foals, Apgar score, blood gas, lactate, electrocardiogram.

### EVALUACIÓN DE LAS NORMAS DE VITALIDAD DEL RECIÉN NACIDO EQUINO – REVISIÓN DE LITERATURA

#### RESUMEN

El período neonatal se caracteriza por una fase de adaptación fisiológica y metabólica, donde los sistemas orgânicos tienen que cumplir con los nuevos desafíos de la vida extrauterina. El conocimiento de la fisiología, el vigor del neonato y la rápida intervención, con respecto a la

<sup>1</sup> Doutorando do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Contato principal para correspondência Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970, Botucatu/SP.

<sup>2</sup> Mestrando do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista.

<sup>3</sup> Professora Doutora do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, de Clínica de Veterinária.

<sup>4</sup> Professor Assistente Doutor do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista.

reanimación, son esenciales para reducir la mortalidad neonatal. Esta revisión de la literatura tiene como objetivo analizar algunos de los principales métodos de evaluación de la vitalidad del neonato equino, teniendo en cuenta la puntuación de Apgar, el análisis de gases en la sangre, el metabolismo de la glucosa y el lactato y del electrocardiograma como los principales procedimientos, además enfatizar los resultados de los estudios que han utilizado esos métodos de evaluación.

**Palabras clave:** potros, Apgar, análisis de gases en sangre, lactato, electrocardiograma.

## INTRODUÇÃO

A neonatologia veterinária é definida como a ciência responsável pelo estudo das primeiras semanas de vida dos recém-nascidos. Apresenta-se em franco desenvolvimento, objetivando a redução das taxas de mortalidade neonatal (1). Neste período, são necessárias importantes adaptações ao meio externo, acompanhadas pelo desenvolvimento de funções vitais não cumpridas durante a vida intrauterina (2).

A avaliação da vitalidade neonatal pode ser realizada por meio de escore Apgar, baseado em parâmetros vitais do recém-nascido (3). A determinação de valores hemogasométricos, permite a avaliação do grau de acidose metabólica e respiração neonatal, sendo de grande importância para a utilização de medidas corretivas precoces (4,5,6).

O exame clínico do neonato equino permite a identificação de sinais de imaturidade, e de traumas que possam ter ocorrido durante o parto ou a presença de anormalidades congênitas. O conhecimento sobre o comportamento do neonato é essencial para o reconhecimento de alterações clínicas, que em geral, estão associadas a alterações fisiopatológicas sistêmicas. A rápida identificação dos sinais clínicos relacionados a qualquer afecção durante o período neonatal favorece o prognóstico, minimizando os prejuízos tanto financeiros, quanto no desempenho de um futuro equino atleta (7).

Estudos aprofundados relacionados à fisiologia do neonato equino e sua evolução clínica no período pós-parto imediato devem auxiliar no aperfeiçoamento da neonatologia veterinária. O presente artigo tem por objetivo discutir sobre alguns dos principais métodos de avaliação da vitalidade do neonato equino, considerando-se o escore de Apgar, hemogametria, metabolismo da glicose e lactato e eletrocardiografia, além de ressaltar os resultados dos estudos que utilizaram esses métodos de avaliação.

## Avaliação do neonato equino

A avaliação clínica dos recém-nascidos, bem como a definição da conduta terapêutica adotada representam expressivos desafios ao médico veterinário. A incapacidade em proceder ao exame físico criterioso, associada à escassez do conhecimento técnico-científico em neonatologia veterinária, colabora com o diagnóstico impreciso e o tratamento empírico das afecções (8).

A avaliação do potro imediatamente após o parto é fundamental para se verificar a vitalidade do mesmo. Por meio desta assistência é possível o clínico optar quando deve adotar o procedimento mais adequado (9). A avaliação da circulação periférica é realizada inspecionando-se as mucosas, que devem ter uma cor rósea e um tempo de preenchimento capilar em torno de dois segundos ou menos, desde o primeiro minuto da vida. Os valores iniciais da frequência cardíaca e respiratória variam de 60-120 bpm e 60-70 mpm, respectivamente (10,11).

Os neonatos são susceptíveis a variações da temperatura ambiente e apresentam dificuldade em manterem a homeotermia, pois possuem maior superfície corpórea em relação à massa, perda de calor por evaporação e reservas calóricas limitadas. A termoneutralidade é,



então, mantida pelo reflexo de tremor (60%) e pelo metabolismo da gordura marrom (40%) (12). Entretanto, não existem evidências da presença da gordura marrom em potros (13). Mesmo com a ingestão de colostro, a principal fonte de energia metabólica do potro é o glicogênio (14,15). A temperatura corporal considerada fisiológica no neonato equino até quatro dias de idade situa-se entre 37,2 a 38,9°C (10).

A maioria das afecções do período periparto é de aparecimento súbito e com sinais clínicos de baixa especificidade, tais como: inatividade, fraqueza, retardo em se levantar ou mamar, hipotermia, hipoglicemia, batimentos cardíacos e movimentos respiratórios com frequência variável (16).

## Escore de Apgar

Introduzido em 1953, por Virginia Apgar, anestesiológica inglesa, o escore de Apgar é um dos métodos mais utilizados na avaliação imediata do recém-nascido (17). Inicialmente desenvolvido como um método de fácil avaliação, visa auxiliar na prática obstétrica e pediátrica (18).

É realizado logo após o nascimento e avalia as condições fisiológicas e a capacidade de resposta do neonato, além de auxiliar na identificação da necessidade de reanimação ou algum outro tipo de cuidado especial (19). Baseia-se na pontuação da frequência cardíaca e respiratória, tônus muscular, atividade reflexa e coloração de pele ou mucosa, realizada nos primeiros minutos após o parto (1).

Por tratar-se de uma prática eficaz na identificação da condição clínica neonatal, o escore de Apgar foi adaptado à Medicina Veterinária de acordo com a fisiologia de cada espécie, sendo utilizado para potros, bezerros, leitões e cães (3). Para os potros, Smith (20) utilizou um sistema de pontuação de APGAR modificado, descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Índice APGAR para neonatos equinos.

	PARÂMETROS	0 Ponto	1 Ponto	2 Pontos
A	Atividade - tônus muscular)	Queda, decúbito lateral	Semi-esternal, alguma flexão dos membros	Posição esternal
P	Pulsção	Ausente	Abaixo de 60 bpm	60 bpm ou mais
G	Expressão facial - estímulo nasal, piparotes na orelha, estímulo toracolombar.	Sem resposta	Expressão facial, movimento da cabeça/pescoço.	Expressão facial forte, espirro, piparote na orelha, sacudidas de cabeça, tentativa de ficar em estação com movimentos de cabeça, pescoço e membros.
A	Aparência - cor das mucosas	Cinza/azuladas	Rosa clara	Rosada
R	Respiração	Ausente	<30, irregular	>30, regular, relinchos

Fonte: Smith (20)

A coloração normal das mucosas é rósea, com discretas variações. Os animais, ao nascimento, apresentam coloração rósea menos intensa. As mucosas podem variar de coloração de acordo com vários fatores, a saber: quantidade e qualidade do sangue circulante, qualidade das trocas gasosas, presença ou não de hemoparasitas, função hepática, medula óssea, entre outros (21). O pulso deve ser entre 60 bpm imediatamente após o parto elevando-se para mais de 100 bpm, dentro da primeira hora de vida. O estímulo tóracolombar é realizado por beliscamento deslizando-se o polegar e o dedo indicador para baixo de cada lado da coluna. A atitude é traduzida no tônus muscular e capacidade de decúbito esternal. As respirações são superficiais e devem ser maiores que 30 movimentos por minuto, imediatamente após o nascimento (20).

O escore de Apgar varia de zero a 10, e para a espécie equina consideram-se ideais valores entre nove e 10 ao nascimento. Escores entre seis a oito indicam asfixia moderada

sugerindo adoção de medidas de reanimação neonatal (12). Potros com escore entre três e cinco, necessitam de oxigênio intranasal e suporte cardiovascular; animais com escore inferior a três necessitam de reanimação imediata (20).

## Hemogasometria

Durante o processo de maturação final do feto equino, ocorre o aumento de corticosteroides associado à maturação pulmonar, à produção de surfactante, aumento das reservas de glicogênio hepático, ativação de vários sistemas enzimáticos e maturação intestinal (22). A síntese de surfactante é influenciada pelo pH, temperatura corporal e perfusão sanguínea, diminuindo nos quadros de hipovolemia, hipoxemia e acidose (23).

O início da respiração pulmonar em neonatos ocorre por estímulos táteis, térmicos e é decorrente da moderada privação de oxigênio durante o parto (24). A hipóxia, hipercapnia e acidose respiratória, que ocorrem durante o trabalho de parto, estimulam o centro respiratório. A separação da placenta e a oclusão do fluxo sanguíneo, limitam as trocas gasosas promovendo a diminuição da pressão parcial de O<sub>2</sub> e pH do sangue, associada a elevação da pressão parcial de CO<sub>2</sub> (14). Durante a primeira inspiração, somente parte dos alvéolos são inflados e, portanto, qualquer influência pode comprometer a adequada expansão alveolar (19).

A Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém Nascido (SDRRN) é o distúrbio respiratório que mais ocorre em humanos. Acredita-se que o principal fator desencadeante em neonatos seja a deficiência na produção de substância surfactante pelos pulmões (24). Em potros, os distúrbios respiratórios, dentre estes a SDRRN são frequentes e responsáveis por 3,6 a 5% da mortalidade neonatal (25), apresentando como principais sinais clínicos, o aumento da frequência e do esforço respiratório, hipoxemia, hipercapnia e acidose respiratória (26).

Os parâmetros mais importantes avaliados na hemogasometria correspondem ao pH, pressões parciais de dióxido de carbono (pCO<sub>2</sub>) e de oxigênio (pO<sub>2</sub>), e bicarbonato (HCO<sub>3</sub>) (27,28), além dos teores de dióxido de carbono total (TCO<sub>2</sub>), e o excesso ou déficit de bases (BE) (29).

Para correção dos desequilíbrios ácido-básicos o organismo utiliza três mecanismos principais, a saber: tamponamento químico pelo bicarbonato, ajuste respiratório e excreção de íons hidrogênio pelos rins. Os sistemas tampões e respiratório atuam dentro de poucos minutos, ao contrário dos rins, que respondem mais tardiamente ao excesso de ácido ou de base (30,31). O mecanismo de compensação renal baseia-se na reabsorção de bicarbonato e eliminação de íons de H<sup>+</sup> com efeitos perceptíveis após uma ou duas horas (32).

Andres et al. (33), constataram alta correlação entre as avaliações de neonatos humanos pelo escore Apgar nos primeiros minutos de vida com a hemogasometria. Em recém-nascidos da espécie suína observou-se maior escore de vitalidade quando as variáveis hemogasométricas encontravam-se dentro dos valores de referência descritos para a espécie (28). Entretanto, existem poucos estudos sobre a existência dessa correlação na espécie equina.

## Metabolismo da glicose e lactato

O controle hormonal do metabolismo energético desempenha papel importante no desenvolvimento e saúde do neonato equino. Durante o crescimento fetal os nutrientes são trocados por meio da placenta, sendo a glicose e o lactato os principais substratos de energia para o feto (34).

As concentrações iniciais em recém-nascidos equinos estão relacionadas aos níveis séricos maternos, com a estabilização da glicemia após duas horas (108-109 mg/dL). Esta

estabilização deve-se à gliconeogênese e alimentação enteral do potro. Em determinados indivíduos, ocorrem falhas nesse processo culminando em hipoglicemia (25). A elevação da glicemia nas primeiras 48 horas, mantém os potros com valores mais elevados até seis meses de idade (120-210 mg/dL) em comparação a equinos adultos (35).

A maioria dos neonatos debilitados também são hipoglicêmicos, principalmente por ocorrer depleção dos estoques de glicogênio e, ainda imaturidade hepática (36). A energia necessária para manutenção dos batimentos cardíacos em quadros de hipóxia advém da glicólise anaeróbica. No entanto o sistema nervoso central não possui reservas de glicogênio e necessita da normoglicemia para seu metabolismo (16).

O lactato desempenha um papel importante na obstetrícia humana como um marcador de angústia fetal e neonatal (37), além de ser um dos principais componentes da acidose metabólica (38). Quando o suprimento de oxigênio para o feto é interrompido, os ácidos começam a se acumular e ocorre acidemia (37).

Estudos demonstram também que a lactatemia fetal é maior do que a materna durante a gestação (39). A concentração de lactato sanguíneo é um indicador prognóstico em humanos e animais, numerosos estudos tem associado a hiperlactatemia a pacientes de alto risco. Segundo Castagnetti et al. (40), o grau e a duração da hiperlactatemia também foram correlacionados com o subsequente desenvolvimento de falência orgânica. Tal comportamento metabólico confere ao lactato o título de marcador de perfusão tecidual, porém muitas são as situações em que seus valores estão elevados e dissociados da hipoperfusão tecidual (41).

A concentração de lactato em potros é elevada ao nascimento ( $3,0 \pm 0,04$  mmol/L a  $4,9 \pm 1,02$  mmol/L), decaindo nas primeiras 24 horas. Hiperlactatemia associa-se a redução da perfusão e da hipóxia tecidual (42). Hiperlactatemia também foi associada com o aumento do metabolismo em casos de inflamação e ativação do catabolismo proteico, como em casos de sepsis. Assim, este parâmetro pode ser usado como marcador de prognóstico em potros em estado crítico (43).

Um estudo realizado por Corley et al. (44), investigando a concentração de lactato arterial em potros criticamente doentes, comprovou que este parâmetro fornecia importantes informações prognósticas. A elevação de lactato estava associada à bacteremia, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), disfunção pulmonar ou circulatória, anemia e hiperglicemia, além de outros processos resultantes de seu metabolismo alterado, incluindo hepatopatias e septicemia (45).

## **Eletrocardiografia**

O eletrocardiograma (ECG) é um registro do potencial elétrico médio gerado no músculo cardíaco durante as diferentes fases do ciclo cardíaco (46). Trata-se de um método pouco oneroso, não invasivo e de fácil realização a campo (47), além de ser a melhor maneira de identificar arritmias, as quais são visualizadas pela forma e frequência das ondas do gráfico gerado (48).

No equino, o ECG é válido para a determinação da frequência, ritmo e tempos de condução (49). Fornece informações quanto ao estado de oxigenação do miocárdio e influências do desequilíbrio eletrolítico e ácido-básico (50). Corley (51) afirma que distúrbios hemodinâmicos são comuns em potros criticamente enfermos e que estes nem sempre demonstram alterações cardiovasculares, o que pode retardar a identificação dos problemas e aumentar a morbidade e mortalidade.

O ritmo cardíaco normal em potros corresponde ao sinusal, com frequência cardíaca variando entre 65 a 135 bpm (52). Fernandes et al. (53), encontraram ritmo sinusal em 100% dos potros estudados, confirmando a fisiologia desse ritmo em potros. A taquicardia sinusal e

as contrações supraventriculares prematuras são consideradas benignas na maioria dos potros, sendo indicativas de reações de estresse não específicas (52).

Equinos saudáveis apresentam incidência de 25% a 30% de arritmias cardíacas (49), sendo várias dessas, consideradas fisiológicas. Yamoto et al. (54), relacionaram a presença de arritmias graves em potros à redução nos níveis de PO<sub>2</sub> quando comparados com potros com arritmias leves, sugerindo desta forma, a presença das formas mais graves em potros com hipoxemia.

Os ECGs em potros mostram predomínio do ventrículo direito e sua regressão ao longo dos primeiros meses de vida (55). Portanto, são raramente utilizados em recém-nascidos para o diagnóstico de hipertrofia ventricular direita ou estenose pulmonar, sendo mais útil na detecção das taquicardias sinusais e alterações inespecíficas de onda T, ambos os sinais, comuns em casos de estresse circulatório. As taquiarritmias supraventriculares e ventriculares ocorrem raramente, e quando observadas, devem-se a distúrbios eletrolíticos, como hipercalemia secundária a ruptura de bexiga. Mudanças na onda T também são observadas em associação com distúrbios eletrólitos, como hipercalemia (10).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pesquisas sobre os diferentes padrões de avaliação da vitalidade do neonato equino auxiliam na identificação das afecções encontradas durante as primeiras horas de vida e orientam a propor um protocolo de avaliação, pois várias das alterações podem refletir simplesmente em uma resposta compensatória ao período crítico de adaptação do recém-nascido.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio à pesquisa (Processo nº 2012/24845-7).

## REFERÊNCIAS

1. Rodrigues JA. Assistência clínica maternal e neonatal às diferentes condições obstétricas em bovinos da raça Holandesa [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2008.
2. Regazzi FM. Modificações pulmonares morfométricas e funcionais de neonatos da espécie canina em resposta à corticoterapia pré-natal [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2011.
3. Veronesi MC, Panzani A, Faustini M, Rota A. An Apgar scoring system for routine assessment of newborn puppy viability and short-term survival prognosis. *Theriogenology*. 2009;72:401-7.
4. Orozco-Gregorio H, Mota-Rojas D, Bonilla-Jaime H, Trujillo-Ortega ME, Becerril-Herrera M, Hernandez-Gonzalez R, et al. Effects of administration of caffeine on metabolic variables in neonatal pigs with peripartum asphyxia. *Am J Vet Res*. 2010;71:1214-9.
5. Trujillo-Ortega M, Mota-Rojas D, Juarez O, Villanueva-Garcia D, Becerril-Herrera M, Hernandez-Gonzalez R, et al. Porcine neonates failing vitality score: physio-metabolic profile and latency to first teat contact. *Czech J Anim Sci*. 2011;56:499-508.

6. Gonzalez-Lozano M, Trujillo-Ortega ME, Alonso-Spilsbury M, Rosales A, Ramirez-Necoechea R, Gonzalez-Maciel A, et al. Vetrabutine clorhydrate use in dystocic farrowings minimizes hemodynamic sequels in piglets. *Teriogenology*. 2007;78:455-61.
7. Barr B. Assessment of the neonatal foal/ treatment considerations. In: *Proceeding of the NAVAC North American Veterinary Conference Congress*; 2007; Orlando, Florida. Orlando, Florida; 2007. p.79-81.
8. Garcia da Silva LC, Lúcio CF, Veiga GAL, Rodrigues JA, Vannucchi CI. Avaliação clínica neonatal por escore Apgar e temperatura corpórea em diferentes condições obstétricas na espécie canina. *Rev Port Cienc Vet*. 2008;103:165-70.
9. Nogueira CEW, Lins LA. *Neonatologia e pediatria equina Vol I*. Pelotas: UFPel; 2009.
10. Koterba AM, Drummond WH, Kosch PC. *Equine clinical neonatology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1990.
11. Pierce SW. Foal care from birth to 30 days: a practitioner's perspective. In: *Proceedings of the 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP)*; 2003; New Orleans, LA. New Orleans, LA: AAEP; 2003. p.13-21.
12. Vaala WE, House JK, Madigan JE. Conduta inicial e exame físico do neonato. In: Smith BP. *Medicina interna de grandes animais*. 3a ed. Barueri: Manole; 2006. p.277-93.
13. Curcio BR, Nogueira CEW. Newborn adaptations and healthcare throughout the first age of the foal. *Anim Reprod*. 2012;9:182-7.
14. Acworth NRL. The health neonatal foal: routine examinations and preventative medicine. *Equine Vet Educ*. 2003;15:45-9.
15. Morresey PR. Prenatal and perinatal indicators of neonatal viability. *Clin Tech Equine Pract*. 2005;4:238-49.
16. Landim-Alvarenga FC. Manejo do neonato. In: Prestes NC, Landim-Alvarenga FC. *Obstetrícia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.158-77.
17. Apgar V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg*. 1953;32:260-7.
18. Kredatusova G, Hajurka J, Szakalova I, Valencakova A, Vojtek B. Physiological events during parturition and possibilities for improving puppy survival: a review. *Vet Med*. 2011;56:589-94.
19. Finster M, Wood M. The Apgar score has survived the test of time. *Anesthesiology*. 2005;102:855-7.
20. Smith BP. *Medicina interna de grandes animais*. Davis: Manole; 2006.
21. Gasparelli ERF, Camargo DG, Yanaka R, Mendes LCN, Peiró JR, Bovino F, et al. Avaliação física e dos níveis séricos de cortisol de bezerros neonatos da raça Nelore, nascidos de partos normais e auxiliados. *Pesqui Vet Bras*. 2009;29:823-8.

22. Silver M, Fowden AL. Pré-parto maturação adrenocortical em o potro fetal: respostas a ACTH1-24. *J Endocrinol.* 1994;142:417-25.
23. Bittar R. Distúrbios respiratórios. In: Rugolo LMS. *Manual de neonatologia.* São Paulo: Revinter; 2002. p.103-23.
24. Vestweber JG. Respiratory problems of newborn calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1997;13:411-24.
25. Kosch PC, Koterba AM, Coons TJ, Webb AI. Developments in management of the newborn foal in respiratory distress 1: Evaluation. *Equine Vet J.* 1984;16:312-8.
26. Lamb CR, O'Callaghan MW, Paradis MR. Thoracic radiography in the neonatal foal: a preliminary report. *Vet Radiol.* 1990;31:11-6.
27. Villanueva-García D, Mota-Rojas D. The highrisk infant and neonatal mortality. In: Mota-Rojas D, Nava-Ocampo AA, Villanueva-Garcia D, Alonso-Spilsbury ML. *Animal perinatology: clinical and experimental approaches.* 1a ed. Mexico: BM Editores Press; 2008. p.305-12.
28. Mota-Rojas D, Orozco-Gregorio H, Villanueva-Garcia D, Bonilla-Jaime H, Suarez-Bonilla X, Hernandez-Gonzalez R, et al. Foetal and neonatal energy metabolism in pigs and humans: a review. *Vet Med.* 2011;56:215-25.
29. Sucupira MCA, Ortolani EL. Uso de sangue arterial e venoso no exame do equilíbrio ácido-básico de novilhos normais ou com acidose metabólica. *Cienc Rural.* 2003;33:863-8.
30. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koo-gan; 2002.
31. Houpt TR. Equilíbrio ácido-básico. In: Reece WO. *Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos.* 12a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.147-60.
32. Houpt TR. Equilíbrio ácido-básico. In: Swenson MJ, Reece WO. *Dukes: Fisiologia dos animais domésticos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.549-59.
33. Andres RL, Saade G, Gilstrap LC, Wilkins I, Witlin A, Zlatnik F, et al. Association between umbilical blood gas parameters and neonatal morbidity and death in neonates with pathologic fetal academia. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181:867-71.
34. Pere MC. Materno-fetal trocas e utilização de nutrientes pelo feto: Comparação entre as espécies. *Reprod Nutr Dev.* 2003;43:1-15.
35. Bauer JE. Normal blood chemistry. In: Koterba AM, Drummond WH, Kosch PC. *Equine Clinical Neonatology.* Philadelphia, USA: Lea & Febiger; 1990. p.602-14.
36. Mancitire DK. Pediatric intensive care. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1999;29:971-88.
37. Blickstein I, Green T. Umbilical cord blood gases. *Clin Perinatol.* 2007;34:451.

38. Borruto F, Comparetto C, Treisser A. Prevention of cerebral palsy during labour: role of foetal lactate. *Arch Gynecol Obstet*. 2008;278:17-22.
39. Marconi AM, Cetin I, Ferrazzi E, Ferrari MM, Pardi G, Battaglia F. Lactate metabolism in normal and growth-retarded human fetuses. *Pediatr Res*. 1990;28:652-6.
40. Castagnetti C, Pirrone A, Mariella J, Mari G. Venous blood lactate evaluation in equine neonatal intensive care. *Theriogenology*. 2010;73:343-57.
41. Silva E, Garrido AG, Assunção MS. Avaliação da perfusão tecidual no choque. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2001;34:27-35.
42. Axon JE, Palmer JE. Clinical Pathology of the Foal. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2008;24:357-85.
43. Henderson RP, Wilkins PA, Boston RC. Association of hyperlactatemia with age, diagnosis, and survival in equine neonates. In: *Proceedings of the 53th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners; 2007; Orlando, FL. Orlando, FL: AAEP; 2007. p.354-5.*
44. Corley KTT, Donaldson LL, Furr MO. Arterial lactate concentration, hospital survival, sepsis and SIRS in critically ill neonatal foals. *Equine Vet J*. 2005;37:53-9.
45. Henry S, Schmeiter P, Jequier E, Tappy L. Effects of hyperinsulinaemia and hyperglycaemia on lactate release and local blood flow in subcutaneous adipose tissue of healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:2891-5.
46. Swenson MJ, Reece WO. *Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos*. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.
47. Verheyen T, Decloedt A, DeClercq D, Deprez P, Sys SU, Van-Loon G. Electrocardiography in horses - part 1: how to make a good recording. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 2010;79:331-6.
48. Lisboa FP, Torres AJ, Amaral LA, Nogueira CEW. Dados preliminares do padrão eletrocardiográfico de equinos da raça Crioula. XVIII CIC – XI ENPOS I Amostra Científica. Pelotas; 2009 [cited 2015 Feb 11]. Available from: [http://www2.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA\\_02098.pdf](http://www2.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA_02098.pdf).
49. Robertson SA. Electrocardiography for the equine practitioner. *Vet Annual*. 1992;32:192-200.
50. Belerenean GC, Mucha CJ, Camacho AA. *Afecções cardiovasculares em pequenos animais*. São Caetano do Sul: Inter Book; 2003.
51. Corley KTT. Monitoring and treating the cardiovascular system in neonatal foals. *Clin Tech Equine Pract*. 2003;2:42-55.
52. Lombard CW. Cardiovascular diseases. In: Koterba AM, Drummond WH, Kosch PC. *Equine clinical neonatology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1990.

53. Fernandes WR, Larsson MHMA, Alves ALG, Fantoni DT, Belli CB. Características eletrocardiográficas em equinos clinicamente normais da raça Puro Sangue Inglês. Arq Bras Med Vet Zootec. 2004;56:143-9.
54. Yamoto K, Yasuda J, Kimehiko T. Electrocardiographic findings during parturition and blood gas tensions immediately after birth in thoroughbred foals. Jpn J Vet Res. 1991;39:143-57.
55. Deegen E. Klinisch elektrokardiographie beim pferdunter berucksichtigung der muskelfmassenverteilung am herzen. Stuttgart: Enke Copythek; 1977.

**Recebido em: 24/07/2014**

**Aceito em: 21/08/2015**



## O COBRE COMO SUPERFÍCIE DE CONTATO ANTIMICROBIANA E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NA MEDICINA VETERINÁRIA

Ronise Faria Rohde Depner<sup>1</sup>  
Rômulo Alexandre Depner<sup>2</sup>  
Vivian Lucca<sup>3</sup>  
Maristela Lovato<sup>4</sup>

### RESUMO

O cobre metálico tem atraído atenção desde 2008, quando quase 300 ligas foram registradas pela agência norte-americana *Environmental Protection Agency* (EPA) como superfícies de contato antimicrobianas. *Escherichia coli* O157:H7; *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (MRSA); *Clostridium difficile*; *Salmonella enterica*; *Campylobacter jejuni*; *Listeria monocytogenes*; *Candida albicans* e Influenza A (H1N1) estão entre os micro-organismos comprovadamente inativados pelo cobre. Ensaios hospitalares demonstraram uma redução de 58% das infecções nosocomiais em pacientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTI) em quartos equipados com superfícies de cobre. O objetivo do trabalho foi avaliar a possibilidade da introdução dessas superfícies nas diversas áreas da veterinária por meio de uma revisão bibliográfica dos principais estudos realizados a respeito do cobre e de suas ligas. Com base nas propriedades bactericidas, fungicidas e viricidas encontradas, pode-se inferir a quantidade de benefícios que o cobre pode trazer à medicina veterinária, tanto na produção animal, quanto em segurança dos alimentos e saúde pública. A aplicação das superfícies antimicrobianas poderá resultar em menores taxas de infecções e menor uso de antibióticos, redução de custos com tratamento, melhor desempenho zootécnico e redução da transmissão de zoonoses.

**Palavras-chave:** cobre antimicrobiano, superfícies de toque, infecção hospitalar, segurança dos alimentos.

### THE COPPER AS AN ANTIMICROBIAL TOUCH SURFACE AND ITS POTENTIAL APPLICATION IN VETERINARY MEDICINE

#### ABSTRACT

The metallic copper has attracted attention since 2008, when nearly 300 alloys were registered by the Environmental Protection Agency (EPA) as antimicrobial touch surfaces. *Escherichia coli* O157:H7; *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA); *Clostridium difficile*; *Salmonella enterica*; *Campylobacter jejuni*; *Listeria monocytogenes*; *Candida albicans* and Influenza A (H1N1) have proven to be inactivated by copper. Hospital assays showed a 58% reduction of nosocomial infections in intensive care units (ICU) in rooms with copper surfaces. This study aimed to assess the possibility of introducing these surfaces in various areas of veterinary medicine through a review of major studies with regard to copper and its alloys. Based on the bactericidal, fungicide and virucide properties found, it can be inferred that the amount of benefits that copper may bring to veterinary medicine, regarding livestock

<sup>1</sup> Médica Veterinária, Mestranda em Medicina Veterinária Preventiva na Universidade Federal de Santa Maria- UFSM. Especialista em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Contato principal para correspondência.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Santa Maria - UFSM Médico Veterinário

<sup>3</sup> Graduanda de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

<sup>4</sup> Prof. Dra. do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

as well as for food safety and public health. The application of antimicrobial surfaces could result in lower rates of infections and less antibiotic use, reduce treatment costs, better production performance and reducing transmission of zoonosis.

**Keywords:** antimicrobial copper, touch surfaces, hospital-acquired infection, food safety.

## EL COBRE COMO SUPERFICIE DE CONTACTO ANTIMICROBIANA Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA MEDICINA VETERINÁRIA

### RESUMEN

El cobre metálico ha atraído atención desde 2008, cuando casi 300 aleaciones fueron registradas por la agencia estadounidense *Environmental Protection Agency* (EPA) como superficies de contacto antimicrobianas. *Escherichia coli* O157: H7; *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA); *Clostridium difficile*; *Salmonella enterica*; *Campylobacter jejuni*; *Listeria monocytogenes*; *Candida albicans* e Influenza A (H1N1) están entre los microorganismos comprobadamente inactivados por el cobre. Ensayos hospitalarios demostraron una reducción de 58% de las infecciones nosocomiales en pacientes de Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) en habitaciones equipadas con superficies de cobre. El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar la posibilidad de introducir esas superficies en diversas áreas de la veterinaria a través de una revisión bibliográfica de los principales estudios realizados a respecto del cobre y de sus aleaciones. Con base en las propiedades bactericidas, fungicidas y virucidas encontradas, se puede inferir la cantidad de beneficios que el cobre puede traer a la medicina veterinaria tanto en la producción animal como en seguridad de los alimentos y la salud pública. La aplicación de las superficies antimicrobianas podrá resultar en menores tasas de infecciones y menor uso de antibióticos, reducción de costos con tratamiento, mejor desempeño zootécnico y reducción de la transmisión de zoonosis.

**Palabras clave:** cobre antimicrobiano, superficies de contacto, infección hospitalaria, seguridad de los alimentos.

### INTRODUÇÃO

O cobre é um elemento de transição na tabela periódica. Sua capacidade de facilmente doar ou receber um elétron é a fonte de muitas de suas propriedades úteis, incluindo condutividade térmica e elétrica e das propriedades eletroquímicas que os sistemas biológicos empregam. Sua forma oxidada é indicada como  $\text{Cu}^{+2}$ , e sua forma reduzida, como  $\text{Cu}^{+1}$ .

Trata-se de um microelemento necessário para quase todos os organismos vivos, incluindo humanos, contribuindo com numerosos processos metabólicos. Entretanto, íons de cobre em níveis elevados são tóxicos para a maioria dos organismos (1). Em humanos, sua deficiência causa anemia, leucopenia, neutropenia, hiperuricemia e retardo no crescimento, e sua toxicidade provoca diarreia, náusea, vômitos, cirrose, anemia e bronquite (2).

Embora a toxicidade humana possa ocorrer, a exposição ao cobre é considerada segura, evidenciada pelo uso disseminado de dispositivos intrauterinos de cobre e pelo baixo risco de reações adversas devido ao contato dérmico com o metal. A baixa sensibilidade do tecido humano ao cobre pode ser contrastada com a dos micro-organismos que são extremamente sensíveis aos seus efeitos tóxicos (3).

O mais antigo uso médico já registrado do cobre é mencionado no Smith Papyrus. Esse texto médico egípcio escrito entre 2.600 e 2.200 antes de Cristo, descreve a aplicação do cobre para esterilizar ferimentos torácicos e água potável. Gregos, romanos, astecas e outros tratavam dores de cabeça, doenças pulmonares, queimaduras, vermes intestinais e infecções

no ouvido e higiene em geral (1,4-6). Sua utilização se difundiu na medicina a partir do século XIX. Seu uso como agente antimicrobiano continuou até a disponibilização de antibióticos em escala comercial em 1932 (3,6).

Mikolay et al. (7) comprovaram, na prática hospitalar, a funcionalidade do cobre e suas ligas, confirmando que essas superfícies podem auxiliar o uso de antibióticos, desinfetantes e a prática de lavagem de mãos, minimizando o risco de aparecimento e disseminação de microorganismos resistentes.

Faúndez et al. (8) afirmam que o cobre metálico pode ser aplicado em áreas com alta exposição à contaminação bacteriana como as encontradas em avicultura. O uso de folhas de cobre como superfície de contato antimicrobiana seria útil para diminuir a contaminação cruzada, causada por bactérias patogênicas como *Salmonella enterica* e *Campylobacter jejuni*.

Apesar da antiguidade de sua descoberta e utilização, o cobre tem suas propriedades ainda pouco exploradas e suas utilidades estão longe de serem esgotadas. Tendo em vista que até o momento não se encontrou nenhuma pesquisa sobre a aplicabilidade das superfícies de contato à base de cobre na medicina veterinária, o presente trabalho objetivou avaliar a possibilidade da introdução dessas superfícies nas diversas áreas da medicina veterinária por meio de uma revisão bibliográfica dos principais estudos realizados a respeito do cobre e de suas ligas.

## O COBRE COMO AGENTE ANTIMICROBIANO

O estudo das propriedades antimicrobianas das superfícies metálicas de cobre é relativamente recente e ganhou destaque quando o órgão norte-americano *Environmental Protection Agency* (EPA) registrou quase 300 superfícies distintas de cobre como antimicrobianas em 2008. Antes disso, uma série de estudos demonstrou o efeito bactericida do cobre e suas ligas contra cinco cepas de bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), *Escherichia coli* O157:H7, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*) testadas de acordo com os protocolos da EPA. O cobre é o primeiro metal a ter reconhecido tal status (3,6,9).

O registro permite a comercialização sob a alegação de que o cobre “mata 99,9% das bactérias dentro de duas horas”. Sua utilização foi autorizada para a fabricação de produtos para ambientes comerciais, residenciais e de saúde. A agência esclarece que as ligas de cobre devem ser utilizadas como um complemento e não para a substituição das práticas padrão de limpeza e desinfecção das superfícies. Acrescenta ainda que tais produtos não representam nenhum risco à saúde pública (10).

### *Aspectos gerais da atividade antimicrobiana*

Com relação à atividade antimicrobiana do cobre e de suas ligas, estudos concluíram que o efeito antimicrobiano aumenta à medida que a temperatura passa da refrigeração para a temperatura ambiente (4,8,11) e à medida que o teor de cobre das ligas aumenta (4,7). A maior resistência à corrosão leva a menor disponibilidade de íons cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) e consequentemente menor atividade antimicrobiana (4,6). As superfícies manchadas liberam  $\text{Cu}^{+2}$  mais facilmente, exibindo atividade inibitória mais rapidamente que as superfícies brilhantes (4). Entretanto, espessa camada de óxido de cobre reduz a atividade antimicrobiana das superfícies de contato (6). Como o efeito antimicrobiano é uma propriedade contínua do cobre, a recontaminação é mitigada (12).

Ainda não foi bem estudado como as sujidades, a limpeza, a exposição a produtos químicos e as manchas afetam as propriedades do cobre. Em estudo conduzido por Airey e Verran (13), as superfícies de cobre e de aço inoxidável foram inoculadas com *Staphylococcus aureus* em solução de albumina a 1%, secas, e depois higienizadas com álcool

70% ou hipoclorito de sódio a 1%, simulando uma situação diária de sujeira/limpeza. Foi observado um aumento do número de células viáveis nas superfícies da sujeira com o passar dos dias. Porém, os produtos utilizados foram reativos ao cobre, não sendo indicados para tais superfícies.

Por outro lado, Wheeldon et al. (14) concluíram que, mesmo na presença de sujidade, o cobre metálico reduziu rapidamente o número de esporos de *Clostridium difficile*. Não houve redução na eficiência antimicrobiana ao longo de 30 ciclos de inoculação bacteriana e subsequente limpeza com detergente não iônico a 1% (6). E, ao longo de dois anos de monitoramento do ambiente hospitalar, as manchas foram mínimas e a atividade antimicrobiana das superfícies não diminuiu (12).

### ***Mecanismo de ação bactericida***

O mecanismo pelo qual se dá a morte microbiana em superfícies de contato de cobre é chamado de “morte por contato”. Ele não está completamente elucidado, porém alguns fatores já foram identificados. Existem diferenças significativas entre a exposição de bactérias a concentrações tóxicas de íons de cobre e a exposição por contato com superfícies metálicas. A exposição, durante o crescimento, a meios contendo íons de cobre, o crescimento em biofilmes de sistemas hidráulicos e a colonização de implantes médicos de cobre são exposições crônicas. O contato com o cobre metálico seco é agudo. Assim, essas células enfrentam desafios diferentes daqueles enfrentados por células cronicamente desafiadas por íons de cobre (6).

A toxicidade ocorre devido à sua tendência em alternar seu estado de oxidação entre cuproso ( $\text{Cu}^{1+}$ ) e cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Em condições aeróbicas, esse ciclo redox leva à geração de radicais hidroxila altamente reativos que danificam as biomoléculas, tais como DNA, proteínas e lipídeos (6,15,16). Fatores que aumentam as espécies reativas de oxigênio (ROS) aumentam a taxa de morte bacteriana. Assim, a produção de radical hidroxila pela reação de Fenton contribui para a inativação (7).

Os íons cobre têm alta afinidade por aminoácidos como a cisteína e a histidina. Isso resulta em proteínas deformadas ou no deslocamento de outros cátions de metais de transição dos seus sítios ativos (15). Entretanto, uma vez que células expostas a superfícies de cobre secas não se multiplicam, os clusters Fe-S sensíveis dentro das proteínas, necessários para o metabolismo das células, não constituem um alvo provável de toxicidade (17).

Superfícies secas de cobre metálico tem maior poder antimicrobiano que as mesmas superfícies úmidas. Em inoculações bacterianas úmidas em superfícies de cobre, os sistemas de homeostase de cobre nas células desempenham um papel claro. Quando deletados os genes de resistência ao cobre, as bactérias foram mortas mais rapidamente. Esses sistemas de resistência prolongaram a sobrevivência, mas não ofereceram proteção contra a “morte por contato” (6).

Células expostas a superfícies secas de cobre acumulam grandes quantidades de íons mais rapidamente que nas superfícies úmidas. Elas sofrem extensos danos nas membranas e perdem a integridade celular em poucos minutos. É provável que as proteínas ou os lipídeos das membranas constituam os maiores alvos de toxicidade. O contato agudo com as superfícies de cobre metálico não resultou em aumento das taxas de mutação ou de alterações no DNA (17).

Warnes et al. (18) descreveram que o DNA é um dos principais alvos da toxicidade do cobre, levando à rápida fragmentação deste e morte celular. As análises do genoma e dos plasmídeos das células bacterianas recuperadas das superfícies metálicas indicaram substancial degradação de DNA após a exposição ao cobre. No entanto, diversos autores afirmam que os danos ao DNA são secundários, ocasionados pela morte celular. A “morte por contato” se efetua pelos sucessivos danos na membrana, influxo de cobre para dentro das

células, danos oxidativos, morte celular e degradação do DNA (6,16,19). Além disso, células de *Deinococcus radiodurans*, que têm grande capacidade de reparar seu genoma e retomar a divisão celular mesmo quando expostas à radiação ionizante, mostraram-se sensíveis à “morte por contato”, indicando que a destruição do DNA não é a causa primária de morte bacteriana (17).

Bactérias que sofrem diversas condições estressantes, frequentemente passam por uma diferenciação fisiológica conhecida como o estado de “viável, mas não cultivável”. Nesse estado, as bactérias ainda estão viáveis e apresentam atividade metabólica e respiração, mas não podem ser detectáveis como Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por contagens em placas. No entanto, as bactérias expostas às superfícies de cobre metálico não entram neste estado, elas são completamente inativadas (15).

Em condições de anaerobiose, a ausência de oxigênio apenas aumentou o tempo necessário para a inativação de  $10^9$  células de *E. coli* (de 1 para 2 minutos) em plaqueamento seco, mas não as protegeu da morte. O contato com as células pode oxidar diretamente a superfície de cobre, levando à liberação de íons  $\text{Cu}^{+1}$ . Esses não são muito solúveis e não são estáveis em aerobiose, porém são mais tóxicos que os íons  $\text{Cu}^{+2}$ . Sendo assim, as condições de anaerobiose não aumentam significativamente a sobrevivência em cobre metálico (15).

### **Mecanismo de ação viricida e fungicida**

Noyce et al. (20), estudando a inativação do vírus da Influenza A (H1N1), concluíram que os íons de cobre podem danificar o RNA genômico do vírus, inibindo sua replicação. Warnes e Keevil (21) afirmam que um dos alvos de toxicidade do cobre é mesmo o genoma viral e que um reduzido número de cópias do gene que codifica a proteína viral VPg (viral-protein-genome-linked), que é essencial para a sua infectividade, foi observado após o contato com superfícies secas de cobre e latão.

O mecanismo da “morte por contato” das leveduras segue as mesmas regras de inativação nas superfícies de cobre observadas para bactérias gram-positivas e gram-negativas (19). Células de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* absorveram grandes quantidades de íons de cobre assim que entraram em contato com a superfície antimicrobiana. A despolarização da membrana citoplasmática foi seguida de um rápido e extenso dano. Os vacúolos se tornaram aumentados e depois desapareceram. Por fim, o estresse oxidativo no citoplasma e nas mitocôndrias foi elevado e não houve efeitos deletérios no material genético. Deletando os genes de resistência, constatou-se que a adequada homeostase aos íons de cobre retardou a cinética da morte celular, mas não a impediu (22).

Com relação à atividade fungicida,  $10^6$  células de *Candida albicans* e de *Saccharomyces cerevisiae* foram inativadas depois de 5 minutos e de 30 segundos de exposição à superfície seca de cobre antimicrobiano, respectivamente. *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* e esporos de *Candida albicans* também já foram inativados nessas superfícies (22).

### **Testes laboratoriais**

A concentração de *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* (patógenos de origem alimentar) e MRSA (causadora de grave infecção nosocomial) reduziu 9 log, chegando a zero, em aproximadamente uma hora, na maioria dos casos (4). Infecções por MRSA causam preocupações também em animais de fazenda. Na Holanda, foi relatada uma nova cepa de MRSA, relacionada a suínos e bovinos, e um levantamento realizado demonstrou que 40% dos suínos eram portadores. Na Coreia, cepas de MRSA foram encontradas em galinhas e vacas leiteiras. MRSA, que se tornou presente também na pecuária, tem o potencial de ser transmitido dos animais para os seus tratadores e destes para o público em geral (9).

Três cepas de MRSA (MRSA, MRSA-1 e MRSA-16) foram completamente inativadas ( $10^7$  log) por superfícies de cobre a 20°C em 45, 60 e 90 minutos, respectivamente. As superfícies de latão (80% Cu) também demonstraram boa capacidade bactericida, porém levaram mais tempo para mostrar reduções significativas das contagens bacterianas. A 4°C, o tempo necessário para a completa inativação bacteriana na superfície de cobre foi maior (3 a 6 horas), porém os resultados demonstram que tais superfícies mantêm sua ação em temperaturas de resfriamento (23).

O cobre e mais cinco ligas foram testados frente a isolados clínicos de importantes patógenos. *Candida albicans* ( $10^7$  UFC/mL) e *Klebsiella pneumoniae* ( $10^8$  UFC/mL) foram completamente inativadas em 60 minutos. *Acinetobacter baumannii* ( $10^7$  UFC/mL) em 180 minutos e *Pseudomonas aeruginosa* ( $10^8$  UFC/mL) e MRSA ( $10^8$  UFC/mL) em 270 minutos. Duas cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* (R267 e R432) mostraram 98% e 88% de inibição, respectivamente (11).

Gould et al. (5) verificaram a completa inativação de bactérias isoladas de pacientes do Reino Unido (MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) em 60 minutos e níveis não detectáveis de *Enterococcus* Vancomicina-resistente (VRE) foram atingidos em apenas 40 minutos. Espírito Santo et al. (19) inativaram  $10^6$  células de *Staphylococcus haemolyticus* em apenas 7 minutos.

*Clostridium difficile* é um importante patógeno formador de esporos que causa diarreia e colite, sendo um dos principais agentes de infecções nosocomiais e um verdadeiro desafio para procedimentos de assepsia (6,14,24). Wheeldon et al. (14) constataram que todas as células vegetativas foram eliminadas em apenas 30 minutos e, apesar de sua maior resistência ao meio, 99,8% dos seus esporos se tornaram inviáveis em 3 horas. WEAVER et al. (24) inativaram células vegetativas e esporos de *Clostridium difficile* em 24-48 horas quando expostos a várias ligas de cobre.

Noyce et al. (20), inocularam  $2 \times 10^8$  partículas do vírus da Influenza A (H1N1) em cobre e em aço inoxidável. Após 24 horas de incubação, encontraram 50.000 partículas virais infecciosas no aço inox e, em apenas 6 horas na superfície de cobre, somente 500 partículas foram detectadas. As norovirose são a principal causa de gastroenterite viral no mundo todo. O vírus é altamente infeccioso e o toque em superfícies contaminadas contribui para a sua disseminação. Warnes e Keevil (21) relataram a rápida inativação do *Norovírus* murino 1 (MNV-1) em cobre, tanto em superfície seca (5 minutos), quanto em superfície úmida (30 minutos). A taxa de inativação foi proporcional ao percentual de cobre nas ligas.

### **Aplicações em Saúde Pública**

As superfícies de toque encontradas em hospitais tais como portas, puxadores, guardas de camas, botões de chamada, assentos sanitários, podem estar altamente contaminadas (6). Esses micro-organismos podem ser transmitidos pelas mãos para outros objetos inanimados ou para pacientes (3).

Ensaio hospitalares estão em curso em todo o mundo e os primeiros resultados já foram relatados. Os números médios de bactérias recuperadas das superfícies contendo cobre foram entre 90% e 100% menores do que os das superfícies controle em um hospital do Reino Unido (25). Já em um posto de saúde em Grabouw, África do Sul, as superfícies de cobre tiveram uma carga microbiana 71% menor (26) e no Asklepios Hospital, em Hamburgo, Alemanha, a redução média foi de 63% (7). Nesse mesmo estudo, observou-se que a taxa de recontaminação das superfícies de cobre foi menor (12,4 UFC/h) do que a taxa das superfícies controle (22,5 UFC/h) evidenciando, assim, a continuada ação antimicrobiana de tais superfícies.

O cobre puro pode não ser um substituto apropriado para o aço inox em ambientes hospitalares. Isso se deve às suas propriedades mecânicas em comparação com o aço

inoxidável e pelo fato de que se oxida em contato com o ar. Entretanto, suas ligas, como o latão, também exibem atividade antimicrobiana. Essas ligas melhoram as propriedades mecânicas e também estéticas das superfícies (27).

Pesquisadores equiparam oito quartos de Unidades de Terapia Intensiva (UTI) em três hospitais, com superfícies de cobre, e utilizaram como controle outros oito quartos com superfícies convencionais. Os resultados do experimento demonstraram uma redução na taxa de infecção hospitalar e/ou colonização dos pacientes por MRSA/VRE de 58% (12). Também já haviam demonstrado que as superfícies de cobre reduziram em 83% a carga microbiana dos quartos dos hospitais (28). Também foi publicado o primeiro estudo de custo-benefício na aplicação de superfícies de contato em cobre no qual foram utilizadas 20 camas e concluiu-se que o investimento seria recuperado em menos de dois meses (29).

O único local de que se tem notícia que faz uso do cobre como superfície antimicrobiana em medicina veterinária é uma clínica na cidade de Phalaborwa, África do Sul. No local, foram instalados uma mesa cirúrgica, interruptores de luz, puxador da porta da geladeira de vacinas, garrafas de desinfetantes, ajuste do foco das luzes da sala cirúrgica e puxadores das mesas em cobre (30). Porém, não foram divulgados dados sobre o impacto da substituição desses equipamentos na carga microbiana do local.

### **Aplicações em alimentos**

As infecções entéricas causadas por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella enterica* são frequentemente associadas à ingestão de carne, ovos e produtos lácteos. A manipulação incorreta e a contaminação cruzada durante os processos industriais podem contribuir para a disseminação desses micro-organismos. Uma significativa atividade bactericida foi verificada quando ambos os patógenos foram colocados em contato com o cobre (8).

A maior via de contaminação por *E. coli* O157 é a carne moída contaminada. Noyce et al. (31) avaliaram a capacidade de inativação dessa bactéria por sete ligas de cobre (61% a 95% Cu), com e sem adição de suco de carne. Sem o extrato de carne, três ligas foram capazes de inativar completamente as bactérias em até seis horas a 22°C. Com o extrato, apenas uma liga obteve o mesmo resultado.

Outro importante patógeno que pode contaminar os alimentos e causar sérios danos à saúde humana, especialmente em mulheres grávidas e pessoas imunossuprimidas, é a *Listeria monocytogenes*. Wilks et al. (32) relataram a completa inativação de  $10^7$  células desta bactéria nas superfícies de cobre em 60 minutos.

Faúndez et al. (8) observaram que as folhas de cobre, inicialmente de aspecto metálico, tornaram-se marrom-escuras e que as suspensões bacterianas foram adquirindo uma cor azul pálida, indicando a liberação de íons  $\text{Cu}^{2+}$ . A potencial aquisição de cobre pelos alimentos expostos à superfície metálica foi então avaliada, utilizando pedaços de carne de frango e suína, e verificaram que ambas, expostas ao cobre puro por duas horas ou mais, absorveram cobre residual. Essa absorção teve apenas um pequeno aumento após os primeiros 50 minutos e os valores tenderam a atingir um máximo de 2.5 mg/100g. Porém, em condições normais de processamento, o tempo de exposição dos produtos alimentícios às superfícies é de poucos minutos, devendo a aquisição de cobre permanecer muito baixa.

A ingestão diária recomendada de cobre é de 0.9 a 1,6mg e o limite máximo é de 10mg para adultos (19-50 anos). A liberação excessiva de cobre é um fator que deve ser levado em conta (8,33). No entanto, Gonçalves et al. (2) afirmam que somente 40% a 50% do total de cobre são absorvidos pelo organismo e que o tipo de processamento que a carne sofre também reduz do cobre disponível para absorção. A cocção reduz em até 50% a disponibilidade do metal; o congelamento *in natura* 38%, e o congelamento de carnes processadas termicamente 26%.

Por fim, Faúndez et al. (8) sugerem que as folhas de cobre poderiam ser utilizadas para diminuir a carga bacteriana persistente após a limpeza diária, evitar a formação de biofilmes, reduzir a viabilidade de bactérias patogênicas, reduzir a contaminação cruzada e/ou para atuar como autodesinfetantes em áreas onde a carga bacteriana é continuamente renovada.

Nas condições normais dos abatedouros, as ligas de cobre podem ser ótimas aliadas no combate a micro-organismos patogênicos, especialmente aquelas com maior teor de cobre. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar a aplicabilidade de tais superfícies em estabelecimentos de produtos de origem animal, principalmente no que concerne à higienização, resistência à corrosão, durabilidade e ao estabelecimento da melhor liga para cada superfície, além da realização de testes para verificar a liberação de cobre das superfícies para os alimentos.

### **Resistência microbiana ao cobre**

Frequentemente, micro-organismos resistentes são isolados a partir de tubulações de cobre e de outras superfícies de cobre expostas à água, onde desenvolvem biofilmes estáveis. Diversas bactérias heterotróficas já foram isoladas de biofilmes em encanamentos de cobre tais como: *Acidovorax delafieldii*, *Flavobacterium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, e *Stenotrophomonas maltophilia*. Nesses casos, os íons são liberados pelas superfícies de cobre, mas as bactérias são resistentes a esses íons. Porém, em superfícies de toque secas, as bactérias não têm tempo para desenvolver biofilmes e o estresse e as condições de sobrevivência são diferentes daquelas dos sistemas aquosos. O estresse está diretamente relacionado ao cobre nas condições a seco, uma vez que tem sido demonstrado que as células expostas a outras superfícies metálicas, tais como o aço inoxidável, não foram inativadas (15).

A resistência ao cobre seco ainda não foi bem estudada, mas o surgimento e difusão de bactérias resistentes à “morte por contato” pelo cobre parece improvável devido às seguintes razões: O DNA dos plasmídeos é completamente degradado após a morte celular, prevenindo a transferência de resistência entre os organismos; a “morte por contato” é muito rápida, e as células não se dividem em superfícies de cobre, impedindo a formação de resistência; o cobre e suas ligas têm sido utilizados pela humanidade há milhares de anos e até agora nenhuma bactéria completamente resistente à “morte por contato” foi descoberta (6).

Pesquisadores verificaram que o DNA bacteriano foi rapidamente destruído em *Enterococcus sp* expostos a superfícies de contato de cobre, o que significa que existe pouca chance de desenvolvimento de resistência a altos níveis de cobre e a antibióticos. A desintegração do ácido nucleico bacteriano dá suporte ao uso de ligas de cobre como superfície antimicrobiana em ambientes hospitalares para inativar as células bacterianas sem a ocorrência de mutações no DNA nem transferência de material genético carreando genes de resistência a antibióticos (18). Assim, parece que o cobre tem potencial para destruir a função celular de várias maneiras e como muitos desses mecanismos agem simultaneamente, a possibilidade de os microrganismos desenvolverem resistência é reduzida (4).

### **Perspectivas**

Novas abordagens estão sendo desenvolvidas. Algumas delas são a inserção de compostos de cobre em fibra de vidro, tintas, vernizes e aço inoxidável, além do desenvolvimento de nanopartículas de cobre e revestimentos de superfícies de silicone com cobre (5). As propriedades antibacterianas e antifúngicas das nanopartículas encontram aplicação em diversos campos como instrumentos médicos, tratamento de água e processamento de alimentos (34).

Os materiais de cobre podem também ser úteis como superfícies antimicrobianas em confinamentos, bebedouros e comedouros para os animais, materiais de gaiolas e recipientes



de armazenamento. Os custos podem ser diluídos pelo menor uso de antibióticos e diminuição do risco de seleção para cepas de bactérias multirresistentes aos antibióticos (1).

Está claro que o uso do cobre e suas ligas como superfície antimicrobiana pode ser de grande valia em diversas áreas da medicina veterinária. Hospitais e clínicas, superfícies de laboratórios, instrumentos cirúrgicos, instalações, fômites, abatedouros, laticínios e outras indústrias de alimentos de origem animal, entre outros. Inúmeras são as possibilidades de pesquisa e aplicação das superfícies de contato do cobre e suas ligas como agentes antimicrobianos. Além da já comprovada ação das superfícies de cobre contra bactérias e vírus e fungos, sua aplicação prática na parasitologia também deve ser considerada, especialmente contra protozoários e ovos de helmintos.

Na avicultura, podemos vislumbrar uma extensa aplicação do cobre e suas ligas, a começar pelos incubatórios onde a limpeza dos equipamentos e da sala de nascimento dos pintainhos é fundamental para a sanidade dos animais. Os desinfetantes utilizados atualmente são a amônia quaternária, glutaraldeído, formaldeído, ácido acético, derivados do cloro e iodo. Porém, grande parte deles possuem restrições de uso, como o formaldeído, conhecido pela sua ação carcinogênica, e o iodo e os ácidos, que possuem ação corrosiva (35).

Com a disseminação dessas superfícies e o melhor entendimento do seu processo de higienização, poder-se-á também reduzir a utilização de detergentes e sanitizantes (redução da frequência das higienizações ou das concentrações utilizadas). Com isso, além do impacto financeiro pela redução de custos, haverá menor impacto ambiental pela redução de resíduos químicos liberados no meio-ambiente.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nas diversas propriedades bactericidas, fungicidas e viricidas encontradas, pode-se inferir a quantidade de benefícios que o cobre deve trazer para a medicina veterinária, tanto na produção animal quanto em segurança dos alimentos e saúde pública. O uso de superfícies antimicrobianas de cobre poderá resultar em menores taxas de infecções e menor utilização de antibióticos, resultando em menores chances de desenvolvimento de micro-organismos multirresistentes, com benefícios para a saúde animal e humana. Poder-se-á contar ainda com a redução de custos com tratamento de doenças animais, melhor desempenho zootécnico, maior lucratividade e menor gasto com saúde pública pela redução da transmissão das zoonoses.

## REFERÊNCIAS

1. Elguindi J, Hao X, Lin Y, Alwathnani HA, Wei G, Rensing C. Advantages and challenges of increased antimicrobial copper use and copper mining. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;91(2):237-49.
2. Gonçalves ECBA, Teodoro AJ, Takase I. Teores de cobre em extratos de carne in natura e processada. *Cienc Tecnol Aliment*. 2007;27(2):298-302.
3. O'Gorman J, Humphreys H. Application of copper to prevent and control infection. Where are we now? *J Hosp Infect*. 2012;81(4):217-23.
4. Michels HT, Wilks SA, Noyce JO, Keevil CW. Copper alloys for human infectious disease control. In: *Proceedings of Materials Science and Technology Conference; 2005; Pittsburgh, PA. Pittsburgh, PA; 2005.*

5. Gould SWJ, Fielder MD, Kelly AF, Morgan M, Kenny J, Naughton DP. The antimicrobial properties of copper surfaces against a range of important nosocomial pathogens. *Ann Microbiol.* 2009;59(1):151-6.
6. Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(5):1541-7.
7. Mikolay A, Huggett S, Tikana L, Grass G, Braun J, Nies DH. Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital Trial. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;87(5):1875-9.
8. Faúdez G, Troncoso M, Navarrete P, Figueroa G. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* 2004;4:19.
9. Michels HT, Noyce JO, Keevil CW. Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* challenged antimicrobial materials containing silver and copper. *Lett Appl Microbiol.* 2009;49(2):191-5.
10. Environmental Protection Agency. EPA registers copper-containing alloy products [Internet]. 2008 [cited 2014 Apr 20]. Washington: EPA; 2008. Available from: <http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/copper-alloy-products.htm>.
11. Mehtar S, Wiid I, Todorov SD. The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study. *J Hosp Infect.* 2008;68(1):45-51.
12. Salgado CD, Sepkowitz KA, John JF, Cantey JR, Attaway HH, Freeman KD, et al. Copper surfaces reduce the rate of healthcare-acquired infections in the intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(5):479-86.
13. Airey P, Verran J. Potential use of copper as a hygienic surface: problems associated with cumulative soiling and cleaning. *J Hosp Infect.* 2007;67(3):271-7.
14. Wheeldon LJ, Worthington T, Lambert PA, Hilton AC, Lowden CJ, Elliott TSJ. Antimicrobial efficacy of copper surfaces against spores and vegetative cells of *Clostridium difficile*: the germination theory. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(3):522-5.
15. Espírito Santo C, Taudte N, Nies DH, Grass G. Contribution of Copper Ion Resistance to Survival of *Escherichia Coli* on Metallic Copper Surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(4):977-86.
16. Souli M, Galani I, Plachouras D, Panagea T, Armaganidis A, Petrikkos G, et al. Antimicrobial activity of copper surfaces against carbapenemase-producing contemporary Gram-negative clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(4):852-7.
17. Espírito Santo C, Lam EW, Elowsky CG, Quaranta D, Domaille DW, Chang CJ, et al. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(3):794-802.

18. Warnes SL, Green SM, Michels HT, Keevil CW. Biocidal efficacy of copper alloys against pathogenic enterococci involves degradation of genomic and plasmid DNAs. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(16):5390-401.
19. Espírito Santo C, Quaranta D, Grass G. Antimicrobial metallic copper surfaces kill *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage. *Microbiologyopen.* 2012;1(1):46-52.
20. Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Inactivation of influenza A virus on copper versus stainless steel surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(8):2748-50.
21. Warnes SL, Keevil CW. Inactivation of norovirus on dry copper alloy surfaces. *PloS One.* 2013;8(9); e75017.
22. Quaranta D, Krans T, Espírito Santo C, Elowsky CG, Domaille DW, Chang CJ, et al. Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(2):416-26.
23. Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *J Hosp Infect.* 2006;63(3):289-97.
24. Weaver L, Michels HT, Keevil CW. Survival of *Clostridium difficile* on copper and steel: futuristic options for hospital hygiene. *J Hosp Infect.* 2008;68(2):145-51.
25. Casey AL, Adams D, Karpanen TJ, Lambert PA, Cookson BD, Nightingale P, et al. Role of copper in reducing hospital environment contamination. *J Hosp Infect.* 2010;74(1):72-7.
26. Marais F, Mehtar S, Chalkley L. Antimicrobial efficacy of copper touch surfaces in reducing environmental bioburden in a South African community healthcare facility. *J Hosp Infect.* 2010;74(1):80-95.
27. Page K, Wilson M, Parkin IP. Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. *J Mater Chem.* 2009; 3819-31.
28. Schmidt MG, Attaway HH, Sharpe PA, John JJ, Sepkowitz KA, Morgan A, et al. Sustained reduction of microbial burden on common hospital surfaces through introduction of copper. *J Clin Microbiol.* 2012;50(7):2217-23.
29. Taylor M, Chaplin S. P368: The economic assessment of an environmental intervention: discrete deployment of copper for infection control in ICUs. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2013;2 Suppl 1:P368.
30. Bryony S. Veterinary Infection Prevention. Antimicrob Copper [Internet]. 2012 [cited 2014 Mar 26]. Available from: <http://www.antimicrobialcopper.com/uk/news-and-download-centre/news/veterinary-infection-prevention.aspx>.
31. Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Use of copper cast alloys to control *Escherichia coli* 0157 cross-contamination during food processing. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(6):4239-44.

32. Wilks SA, Michels HT, Keevil CW. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implication for cross contamination. Int J Food Microbiol. 2006;111(2):93-8.
33. Andrade ECB, Barros AM, Mello VS, Takase I. Avaliação do teor de cobre e zinco em carnes cruas, processadas termicamente, resfriadas e congeladas no período de um mês. Cienc Tecnol Aliment. 2004;24(3):393-6.
34. Ramyadevi J, Jeyasubramanian K, Marikani A, Rajakumar G, Rahuman AA. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. Mater Lett. 2012;71:114-16.
35. Macari M, Gonzales E. Manejo da incubação. 2a ed. Campinas: FACTA; 2003.

**Recebido em: 24/09/2014**

**Aceito em: 07/10/2015**

## SYSTEMATIC REVIEW: THE IMPORTANCE OF WATER IN THE EPIDEMIOLOGY OF CRYPTOSPORIDIOSIS IN BRAZIL\*

Luiz da Silveira Neto<sup>1</sup>  
Sandra Valéria Inácio<sup>2</sup>  
Katia Denise Saraiva Bresciani<sup>3</sup>

### ABSTRACT

This is a review of the scientific literature on the presence and types of *Cryptosporidium* spp. in Brazilian water sources. We assess the importance of waterborne oocyst in the epidemiology of cryptosporidiosis in Brazil. The PubMed, ScienceDirect, and Scielo databases were searched using the following keywords: “*Cryptosporidium* and Waterborne”, “*Cryptosporidium* and Water”, “*Cryptosporidium* and Brazil”, “*Cryptosporidium* and Environment”, “*Cryptosporidium* and Brazil and Environmental”, “*Cryptosporidium* and Brazil and waterborne and Environmental”. We discuss original articles focused on waterborne cryptosporidiosis published in Portuguese or English and reporting research performed in Brazil. We excluded studies undertaken in countries other than Brazil and articles not directly relevant to waterborne cryptosporidiosis. Using the above listed search terms, a total of 149 articles were found in PubMed, of which 10 were met the inclusion criteria; in the ScienceDirect database, we found 306 articles all of which were excluded because they were foreign articles. In Scielo, 214 articles were found, of which we selected 8. Thus, 18 studies were analyzed. According to these publications, a large part of the Brazilian population is at risk of infection by this protozoan. We conclude that research on waterborne transmission of cryptosporidium should be intensified and should include regions of Brazil which are understudied. This research is particularly relevant to populations affected by AIDS or living in communities where AIDS is highly prevalent.

**Keywords:** *Cryptosporidium*, cryptosporidiosis, public health, environmental contamination, water contamination.

### REVISÃO SISTEMÁTICA: A IMPORTÂNCIA DA ÁGUA NA EPIDEMIOLOGIA DA CRIPTOSPORIDIOSE NO BRASIL

#### RESUMO

Este trabalho é a compilação de publicações científicas que buscaram ativamente *Cryptosporidium* sp. em recursos hídricos brasileiros, e quais espécies foram mais encontradas, com o intuito de investigar qual é a importância da água na epidemiologia da criptosporidiose neste país. As bases de dados consultadas foram Pubmed, ScienceDirect e Scielo, por meio das palavras-chave: “*Cryptosporidium* and Waterborne”, “*Cryptosporidium* and Water”, “*Cryptosporidium* and Brazil”, “*Cryptosporidium* and Environment”, “*Cryptosporidium* and Brazil and Environmental”, “*Cryptosporidium* and Brazil and waterborne and Environmental”. A seleção foi realizada por critérios de inclusão, sendo estes: artigos originais sobre criptosporidiose por meio hídrico publicados em português ou inglês

\* Apoio e financiamento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (proc. 2010/51111-9)

<sup>1</sup> Sociedade Educacional de Itapiranga. Faculdades de Itapiranga (SEIFAI). Curso de Medicina Veterinária. Itapiranga, SC. Contato principal para correspondência.

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Animal Science. School of Veterinary Medicine. UNESP-Univ Estadual Paulista. Araçatuba, SP, Brazil

<sup>3</sup> Department of Animal Health, Production and Support. School of Veterinary Medicine. UNESP-Univ Estadual Paulista. Araçatuba, SP, Brazil.

conduzidos no Brasil. Os seguintes critérios de exclusão foram adotados: trabalhos estrangeiros, revisões de literatura ou assuntos não pertinentes ao foco desta pesquisa. Na base de busca do Pubmed, foram encontrados 149 artigos, dos quais se selecionaram dez; na ScienceDirect 306 trabalhos foram identificados, sendo considerados inviáveis para revisão, pois são artigos estrangeiros; e na Scielo, 214 artigos, dos quais selecionaram-se oito. Desta forma, 18 estudos foram analisados. Há evidências de que uma grande parte da população brasileira esteja em risco de infecção por este protozoário e estudos acerca deste assunto deveriam ser intensificados e distribuídos de maneira mais uniforme a fim de beneficiar um maior número de brasileiros, especialmente em regiões onde as taxas de prevalência e de incidência de AIDS são mais elevadas.

**Palavras-chave:** *Cryptosporidium*, saúde pública, criptosporidiose, contaminação ambiental, contaminação hídrica.

## REVISIÓN SISTEMÁTICA: LA IMPORTANCIA DEL AGUA EN LA CRIPTOSPORIDIOSIS EPIDEMIOLOGÍA EN BRASIL RESUMEN

El presente trabajo es una recopilación de las publicaciones científicas que buscaban activamente *Cryptosporidium* sp. en los recursos hídricos de Brasil, y que las especies aisladas, con el fin de investigar lo que es la importancia del agua en la epidemiología de la criptosporidiosis en este país. Las bases de datos consultadas fueron PubMed, ScienceDirect y Scielo, a través de las palabras clave: "*Cryptosporidium* and Waterborne", "*Cryptosporidium* and Water", "*Cryptosporidium* and Brazil", "*Cryptosporidium* and Environment", "*Cryptosporidium* and Brazil and Environmental", "*Cryptosporidium* and Brazil and waterborne and Environmental". La selección se realizó mediante criterios de inclusión, a saber: artículos originales sobre el medio ambiente del agua de la criptosporidiosis publicados en portugués o inglés realizados en Brasil. Se adoptaron los siguientes criterios de exclusión: estudios extranjeros, revisiones bibliográficas o no pertinentes para el enfoque de estos temas de investigación. En la búsqueda de bases de datos Pubmed se encontraron 149 artículos, de los cuales se seleccionaron diez; ScienceDirect en 306 artículos fueron identificados para su revisión se consideraron inviable, ya que son artículos extranjeros y Scielo, 214 artículos, de los cuales se seleccionaron ocho. Por lo tanto, se analizaron 18 estudios. Hay evidencia de que una gran parte de la población está en riesgo de infección por este protozoo y estudios sobre este tema deben ser intensificados y extendidos de manera más uniforme con el fin de beneficiar a un mayor número de brasileños, especialmente en las regiones donde las tasas de prevalencia y la incidencia del SIDA son más frecuentes

**Palabras clave:** *Cryptosporidium*, salud pública, criptosporidiosis, contaminación ambiental, contaminación hídrica.

## INTRODUCTION

The genus *Cryptosporidium* comprises obligate parasitic protozoa. These pathogens parasitize the epithelial cells of the gastrointestinal tract of their hosts (1), which include mammals, birds, reptiles and fish (2). To date, 30 *Cryptosporidium* species have been described, 12 infecting mammals. In addition 61 genotypes of uncertain taxonomic status have been identified based on host specificity and genotypic properties (3-5).

Morphology and antigenic properties cannot discriminate between different *Cryptosporidium* species because oocytes show little morphological variations. The presence of conserved antigens hinders species differentiation by immunological tests (1,6). Thus,

molecular tools are essential in identifying which species are present in a host or in water and which species are most relevant to public health. Thus far, five species have been found to infect humans: *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium felis*, and *Cryptosporidium canis* (7-10).

The presence of this parasite has been reported in humans. Historically, outbreaks of waterborne cryptosporidiosis were associated, in large part, to access of human beings to water reservoirs (11-13).

The first recorded outbreak caused by contaminated drinking water occurred in 1989 in Swindon and Oxfordshire in the United Kingdom, affecting about 5,000 people (14). In 1993, a larger outbreak afflicted 403,000 residents of Milwaukee in the United States (15). These outbreaks were linked to water as the main route of transmission. Contamination of drinking water with oocysts occurred even after treatment (16).

In 2004, cryptosporidiosis was included in the Neglected Diseases Initiative of the World Health Organization because of its close association with poor sanitation and low purchasing power (17). To assess the importance of water in the epidemiology of cryptosporidiosis in Brazil, here we summarize the scientific literature describing the presence and the species types of *Cryptosporidium* oocysts in Brazilian water sources.

## METHODS

The PubMed (<http://www.pubmed.org>), Scielo (<http://www.scielo.org>), and ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>) databases were searched in December 2012. The keywords used were “*Cryptosporidium* and Waterborne”, “*Cryptosporidium* and Water”, “*Cryptosporidium* and Brazil”, and “*Cryptosporidium* and Environment”. The term *Cryptosporidium* was used alone to quantify the sample universe in each database and to define the selection strategy of items. For databases with a sampling universe of <500 publications, a bibliographic triage was done by reading the title and abstract; when >500 publications were identified, a triage was performed directly by using the keywords “*Cryptosporidium* and Brazil and Waterborne and Environment”. Literature reviews, experiments conducted abroad, and articles not relevant to the purpose of this study were excluded.

## RESULTS AND DISCUSSION

The keyword “*Cryptosporidium*” retrieved very different publication lists from three databases. We found 214 publications in Scielo, 10,378 in ScienceDirect, and 6,527 in PubMed (Table 1).

Applying the exclusion criteria for this systematic review, 8 scientific articles were found in Scielo and 10 articles in PubMed, with one article in common to these databases. No publication from ScienceDirect was included because all indexed studies were conducted in foreign regions, even if the word “Brazil” was included in the keywords searched. Therefore, in this review, we included 18 articles related to the importance of water in the epidemiology of cryptosporidiosis in Brazil. The oldest article in our list was published in 1993, with a new publication only 7 years later. In 1990’s, four papers were published compared with 14 in the next decade, equivalent to an increase of almost 350% in scientific productivity.

Table 1. Number of publications about cryptosporidiosis retrieved in different databases according to the keyword(s) used.

Keywords	Number of publications by database		
	Scielo	ScienceDirect	PubMed
<i>Cryptosporidium</i>	214	10378	6527
<i>Cryptosporidium</i> AND Waterborne	9	2026	438
<i>Cryptosporidium</i> AND Water	50	6811	1656
<i>Cryptosporidium</i> AND Brazil	58	1244	149
<i>Cryptosporidium</i> AND Environmental	43	63	960

Among the 18 articles reviewed here, 6 (33.3%) were conducted exclusively in the region of Campinas, SP; 14 (77.8%) in the state of São Paulo; 1 (5.6%) in Minas Gerais; and 2 (11.1%) and 1 (5.6%) in the northeast and south of Brazil, respectively. This distribution seems to reflect that microbiological analysis of water was performed just in close proximity to the study institutions routinely. The University of Campinas (UNICAMP) and the University of São Paulo (USP) published the largest number of articles, representing 38.9% and 33.3% of the selected publications, respectively. The high percentage of work conducted in the state of São Paulo only benefits directly the local population, which is <17.6% of the national population (18).

This becomes even more critical considering that *Cryptosporidium* spp. were detected in water samples in 17 of 18 (94.4%) of the screened articles; however, only one study performed molecular characterization to assess if the oocysts were pathogenic to man.

Newman et al. (19) searched for water sources contaminated with *Cryptosporidium* in an urban slum in Fortaleza, in the state of Ceará, where cryptosporidiosis is common. Stool samples from 127 domestic animals and 18 local water sources were examined using acid fast staining and immunofluorescence techniques. Oocysts were detected in 10.2% of stool samples from domestic animals and in 22.2% of water sources. The authors concluded that the animals may be involved in water contamination, which could explain the high prevalence of the disease in this region.

Gamba et al. (20) sampled 10 deep wells and two septic tanks in the municipality of Itaquaquecetuba, São Paulo, a region with a high infant mortality. Convenience sampling was done, selecting critical locations and considering inadequate construction and/or proximity between a well and a septic tank. Oocysts were concentrated using the calcium carbonate flocculation method, and the Merifluor commercial kit (Meridian BioScience) was used to detect oocysts. Two of 10 wells and 2 of 2 septic tanks were positive for *Cryptosporidium* spp. The authors suggested a need for monitoring the water supplies of São Paulo.

Franco et al. (21) investigated water samples from the Atibaia River, Campinas, São Paulo, collected during three consecutive weeks. The membrane filtration technique was used to concentrate the oocysts, which were recovered by two different methods: membrane washing and scraping or dissolving it in acetone. All samples were positive. The authors recommend further work to determine the viability of these oocysts in order to assess their impact on public health.

Farias et al. (22) collected 24 effluent samples evenly distributed between the Edu Chaves Sewage Pumping Station and the Pirajussara creek in São Paulo between July and December 1998. Calcium carbonate flocculation and membrane filter dissolution were used to concentrate the oocysts. All samples were positive for *Cryptosporidium* spp., with a range of 80–912 and 65–760 oocysts/L in raw sewage and creek samples, respectively. The efficiencies of the oocyst concentration techniques did not differ, but the authors suggest the development of new methods aimed at minimizing losses of oocysts during the procedure.



Feitosa et al. (23) assessed the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in stool samples from 459 newborn calves and in water and samples from the hutch floors of 33 dairy farms in the Araçatuba region, state of São Paulo. The prevalence of cryptosporidiosis in animals was 10.3% by enzyme-linked immunosorbent assay and 12.4% using the Sheather's flotation method. Water samples were negative, and two soil samples were positive. However, the analysis of environmental contamination may have underestimated the actual contamination owing to the method employed. The oocysts were concentrated exclusively by Sheather's method, unlike the techniques employed in other studies described in this review.

Santos et al. (24) collected samples of activated sludge from the sewage treatment station in Campinas, São Paulo, for eight consecutive weeks. The samples were analyzed using two methods of oocyst concentration: clarification with ether and sucrose flotation, followed by the use of two commercial fluorescent monoclonal antibody kits to detect oocysts (Merifluor, Meridian BioScience, and Crypto/*Giardia*-Cel I. F. Test, CELLABS PTY LTD). *Cryptosporidium* oocysts were present in 5 of 8 (62.5%) samples, considering all the techniques used to concentrate and detect oocysts. The authors concluded that viability studies of the protozoan found are required before the activated sludge is reused in agriculture, since it could endanger public health.

Hachich et al. (25) assessed the presence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in drinking water sources in the state of São Paulo, Brazil. A total of 278 water samples were collected during a period of 19 months from 28 locations in 10 watersheds. Oocysts were concentrated and visualized using calcium carbonate flocculation followed by direct immunofluorescence. The authors reported that 27% and 2.5% were contaminated with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium*, respectively. The authors warned about the need to improve the quality of drinking water used in the state of São Paulo.

Iacovski et al. (26) investigated the presence of *Cryptosporidium* spp. by immunomagnetic separation (IMS) followed by immunofluorescence in sludge samples obtained from the Municipal Wastewater Treatment Plant in Florianópolis, in the state of Santa Catarina. Among the 27 samples, 20 (74.1%) were positive for coccidia. The method applied in this study was an effective multiple analysis tool for monitoring the presence of *Cryptosporidium* oocysts in sludge samples originating from urban wastewater. The authors warned about the risk of oocyst contamination of sludge intended for land application.

Neto et al. (27) investigated the efficiency of (oo)cyst removal by an activated sludge reactor and ultraviolet (UV) light in a wastewater treatment plant in Campinas, SP. Three sampled sites were evaluated for the study: influent, wastewater without UV treatment, and wastewater disinfected with UV. *Cryptosporidium* oocysts were found in two influent samples and in one effluent disinfected with UV radiation. The authors concluded that activated sludge treatment reduced cysts and oocysts by 98.9% and 99.7%, respectively, whereas the UV disinfection process was not completely effective way to inactivation against *Giardia* spp.

Rondello et al. (28) compared two methods for detecting *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in samples of activated sludge from a sewage treatment plant in the city of Campinas, SP. A total of 22 samples were assessed for the presence of these protozoa after concentration by centrifugation, followed or not by purification (clarification with ether and sucrose flotation). The recovery rate of *Giardia* cysts was higher in the absence of purification. No significant differences between the two methods were found in the detection of *Cryptosporidium* oocysts, as only two samples were positive. The researchers concluded that centrifugation is the simplest and cheapest method for (oo)cyst concentration.

Dias et al. (29) examined samples from eight watersheds, raw sewage from two swine facilities and wastewater treatment effluent (WWTE) in the Ribeirão São Bartolomeu basin, municipality of Viçosa, MG. Quarterly samples were collected at each point for a year to investigate the prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. and their possible

seasonality. Oocysts were concentrated by calcium carbonate precipitation and detected by direct immunofluorescence. The geometric mean concentration of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts water sources was 3.9 cysts/L and 3.6 oocysts/L, respectively. There was a high concentration of *Giardia* spp. (geometric mean in the order of  $10^4$ /L) but not *Cryptosporidium* spp. in the effluent of the WWTE. The mean values of (oo)cysts and rainfall collection of the quarter were well correlated ( $R^2 = 98.3\%$ ;  $P = 0.0087$  for *Giardia* spp. and  $R^2 = 91.8\%$ ;  $p = 0.0421$  for *Cryptosporidium* spp.), which indicates a seasonal pattern. The authors recommend the protection of watershed areas to prevent the transmission of waterborne parasitic diseases.

Machado et al. (30) studied the occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in raw surface water, from September 2003 to August 2004 in Recife, PE. The samples were analyzed for 12 months during periods of drought and normal rainfall. Water samples were collected in the catchments of the Tapacurá River, Capibaribe River in Tiúma, Capibaribe River in Castelo, and River Duas Unas. Samples from the inlet and outlet of the treatment system were stored in five-gallon containers. A total of five sites and 60 samples of raw water and 12 treated water samples were analyzed for the presence of oocysts. Samples were filtered with cellulose ester membranes under negative pressure to concentrate oocysts (31). To detect the oocysts, the authors used a direct immunofluorescence technique (Merifluor kit; Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, OH, USA) as recommended by the manufacturer, together with the dye 4'6'-diamidino-2-phenylindole (32). A mathematical formula was used to calculate the average number of oocysts per liter (33). Samples of raw and treated water were analyzed, and distilled water used as a negative control. Tests were carried out with two replicates for each sample type. *Cryptosporidium* oocysts were provided by the parasitology section of the Central State Laboratory, purified by flotation with a 1.2 g/mL saturated NaCl solution (34) and quantified according to the Kinyoun method and preserved in 10% formalin under refrigeration. Samples were inoculated according to the protocol of the USEPA Method 1622 (35). The treated water was negative for *Cryptosporidium* oocysts. However, raw water samples were positive by IFA/DAPI in 40% (2 of 5) of the locations and 5% (3 of 60) of the samples. There was a cattle pen near the pickup point of the Tapacurá River, was identified as possible source of oocysts (36). This was the first report of *Cryptosporidium* oocysts water sources in Pernambuco and the northeast of the country.

Razzolini et al. (37) detected the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in watersheds and drinking water sources in urban areas of Brazil. A total of 25 samples, 12 drinking water and 13 surface water, were examined (38). *Giardia* cysts were detected in 41.7% and *Cryptosporidium* oocysts in 25.0% drinking water samples. Positive samples from raw water for *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts were 46.1 and 7.6%, respectively. The results of this study point to the need to monitor these organisms in drinking water and river basins.

Neto et al. (39) evaluated the presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. (oo)cysts in the water supply of Campinas, SP, which draws water from the Atibaia River. Protozoa were detected by immunofluorescence assay (IFA) and confirmed by differential interference contrast microscopy. *Cryptosporidium* oocysts were detected in 62.5% of samples with concentrations ranging from 15 to 60 oocysts/L. *Giardia* spp. cysts were detected in 87.5% of samples studied, at concentrations from 2.5 to 120 cysts/L. The authors considered the values high and associated high oocyst and cyst concentrations to the discharge of untreated sewage into the Atibaia River. Thus, they recommended the adoption of measures to protect sources of drinking water.

Santos et al. (40) collected 53 samples of raw sewage, 53 samples of treated sewage without disinfection by UV light (EFL), and 38 samples treated and disinfected by this technique (EFL + UV) from the Campinas Sewage Treatment Plant. The samples were concentrated by two methods: centrifugation-flotation or membrane filtration.

*Cryptosporidium* oocysts were detected in 6.4% of raw sewage samples and 2.6% of UV treated effluent samples. No statistical differences were noted in the results between the concentration methods used.

Araújo et al. (41) surveyed 30 different locations in the state of São Paulo for the presence of waterborne *Cryptosporidium* oocysts. The polymerase chain reaction was used to amplify a portion of the 18S rRNA gene. DNA was extracted from water concentrate samples recovered by filtration. *Cryptosporidium* DNA was detected in 30% of the samples. Sequencing of the 18S amplicons revealed the presence of *Cryptosporidium hominis* and *C. meleagridis*. Samples of recreational water were also positive for *Cryptosporidium* spp. *C. hominis* and *C. meleagridis* were identified in surface water samples. This was the first report of *C. hominis* in environmental samples in Brazil.

Branco et al. (42) investigated the occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in natural springs and residents of Campos do Jordão, SP. They evaluated 12 springs (six in urban areas and six in rural areas) bimonthly for a year, in three strategic occasions: dry season (June to September), the rainiest months (October to January), and the drier months (February to May). The samples were subjected to membrane filtration followed by elution and centrifugation. Water pellets were analyzed by IFA using monoclonal antibodies and visualized by phase contrast microscopy. At least one of these protozoa was detected in 25.0% (3 of 12) of the spring samples, with mean concentrations ranging from 0.2 to 0.3 oocysts/L and 0.07 to 0.1 cysts/L. Enteroparasites were detected in 91 of 185 stool specimens analyzed. *Cryptosporidium* spp. was the most prevalent parasite (8.1%), followed by *Giardia*. (5.9%). The authors concluded that the high prevalence of parasitic infections in specific populations favors transmission through contaminated soil and water, contributing to the maintenance of the parasite's life cycle. Thus, it would be necessary to adopt measures such as protecting the springs, installing a minimum health infrastructure, and providing primary education to the population, in order to control and prevent infections by these parasites.

Sato et al. (43) assessed the risk of infection by *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp., and the prevalence of these protozoa in the public water supply in four urbanized areas of São Paulo State, Brazil. The collection points were located in nine different watersheds of the eastern region of the state covering the Metropolitan Region of São Paulo (MASP), Campinas Metropolitan Region (CMR), Metropolitan South Coast (MRSC), and Paraíba Valley region (VPR), which together comprise 58% of the area of the state of São Paulo and 13% of the state's population. A total of 206 samples from 28 localities were examined for 24 months. Protozoa were detected by IMS-IFA. *Giardia* cysts were detected in 49.5% (102 of 206) of samples with concentrations ranging from 0.1 to 97 cysts/L, whereas *Cryptosporidium* oocysts were present in 9.2% (19 of 206) of samples with concentrations ranging from 0.1 to 6.0 oocysts/L. The highest frequency of positive samples and the highest concentrations of oocysts were observed in the metropolitan region of Campinas(44). The results indicated that infection risks by these protozoans are higher than what is considered acceptable by the World Health Organization (44). These observation highlight the need to implement safety measures for water intended for public consumption.

From 1980 to June 2011, a total of 608,230 cases of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) were reported in Brazil, with 343,095 (56.4%) in the southeast, 123,069 (20.2%) in the south, 78,686 (12.9%) in the northeast, 35,116 (5.8%) in the midwest region, and 28,248 (4.7%) in the northern region (45). Although the largest proportion of cases nationwide was reported in the southeastern region, we note an increase in the incidence in other Brazilian regions. Among the five regions of the country, from 1998 to 2010, there was a 30.9% decrease in the incidence in the southeast, which had 56.4% of the total accumulated cases in the country, and an increase in other regions. Of the 27 federative units, in 2010, eight of them had higher incidence rates than the national average (17.9 in 100,000 inhabitants): Amazonas (30.9), Roraima (35.7), and Pará (19.5) in the north; Espírito Santo

(20.4) and Rio de Janeiro (28.2) in the southeast; and all southern states. Considering that cryptosporidiosis is more severe in immunosuppressed individuals and can be fatal, there is a clear need for decentralizing research on the importance of water in the epidemiology of cryptosporidiosis and to expanding research coverage to other populations at risk.

## FINAL COMMENTS

Waterborne *Cryptosporidium* oocysts were found in almost all studies carried out in Brazil. However, molecular characterization efforts to verify the zoonotic or anthroponotic potential of circulating protozoans in Brazilian waters are scarce. Although the authors suggest the need to develop new techniques to concentrate oocysts, they do not usually differ in the work presented. Finally, there is evidence that a large part of the population is at risk of infection by this protozoan. Studies on this subject should be intensified and extended to understudied geographical areas. The results obtained can benefit many Brazilians, especially those in regions where the prevalence and incidence of AIDS is high.

## REFERENCES

1. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol*. 2000;30(12-13):1305-22.
2. Fayer R, Speer CA, Dubey JP. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer R. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Boston: CRC Press; 1997. p.1- 42.
3. Carreno RA, Martins DS, Barta JR. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res*. 1999;85(11):899-904.
4. Plutzer J, Karanis P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Vet Parasitol*. 2009;165(3-4):187-99.
5. Smith HV, Nichols RAB. *Cryptosporidium*: detection in water and food. *Exp Parasitol*. 2010;124(1):61-79.
6. Meireles MV. *Cryptosporidium* e criptosporidiose uma análise crítica. In: 14º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária; 2006; Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: Centro de Convenções de Ribeirão Preto; 2006. p.153-4.
7. Fayer R, Trout JM, Xiao L, Morgan UM, Lal AA, Dubey JP. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol*. 2001;87(6):1415-22.
8. Cacciò SM, Pinter E, Fantini R, Mezzaroma I, Pozio E. Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(1):85-6.
9. Thompson RCA, Palmer CS, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J*. 2008;177(1):18-25.
10. Smith RP, Chalmers RM, Elwin K, Clifton-Hadley FA, Mueller-Doblies D, Watkins J, et al. Investigation of the role of companion animals in the zoonotic transmission of cryptosporidiosis. *Zoonoses Public Health*. 2009;56(1):24-33.

11. Cardona GA, Carabin H, Goñi P, Arriola L, Robinson G, Fernández-Crespo JC, et al. Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. *Sci Total Environ*. 2011;412-413:101-8.
12. Hira KG, Mackay MR, Hempstead AD, Ahmed S, Karim MM, O'Connor RM, et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. from Bangladeshi children. *J Clin Microbiol*. 2011;49(6):2307-10.
13. Lim YA, Iqbal A, Surin J, Sim BL, Jex AR, Nolan MJ, et al. First genetic classification of *Cryptosporidium* and *Giardia* from HIV/AIDS patients in Malaysia. *Infect Genet Evol*. 2011;11(5):968-74.
14. Richardson AJ, Frankenberg RA, Buck AC, Selkon JB, Colbourne JS, Parsons JW, et al. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. *Epidemiol Infect*. 1991;107(3):485-95.
15. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*. 1994;331(3):161-7.
16. Tzipori S, Giovani W. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol*. 2008;24(4):184-9.
17. Savioli L, Smith H., Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol*. 2006;22(5):203-8.
18. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2012 [cited 2012 Jan 14]. Available from: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br).
19. Newman RD, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49(2):270-5.
20. Gamba RC, Ciapina EMP, Espíndola, RS, Pacheco A, Pellizari VH. Detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba City, S. Paulo-Brazil. *Braz J Microbiol*. 2000;31(2):151-3.
21. Franco RMB, Rocha-Eberhardt R, Cantusio-Neto R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2001;43(2):109-11.
22. Farias EWC, Gamba RC, Pellizari VH. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2002;33(1):41-3.
23. Feitosa FLF, Shimamura GM, Roberto T, Meireles MV, Nunes CM, Ciarlini PC, et al. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. *Cienc Rural*. 2004;34(1):189-93.

24. Santos LU, Bonatti TR, Cantusio-Neto R, Franco RMB. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2004;46(6):309-13.
25. Hachich EM, Sato MI, Galvani AT, Menegon JR, Mucci JL. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. *Water Sci Technol*. 2004;50(1):239-45.
26. Iacovski RB, Barardi CR, Simões CM. Detection and enumeration of *Cryptosporidium* sp. oocysts in sewage sludge samples from the city of Florianópolis (Brazil) by using immunomagnetic separation combined with indirect immunofluorescence assay. *Waste Manag Res*. 2004;22(3):171-6.
27. Neto RC, Santos LU, Franco RM. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. *Water Sci Technol*. 2006;54(3):89-94.
28. Rondello BT, Bueno FRM, Neto RC. Comparison of two methodologies for detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in activated sludge samples from a sewage treatment plant in the city of Campinas, São Paulo State, Brazil. *J Water Health*. 2007;5(4):609-14.
29. Dias GMF, Bevilacqua PD, Bastos RKX, Oliveira AA, Campos GMM. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2008;60(6):1291-300.
30. Machado ECL, Stamford TLM, Machado EHL, Soares DS, Albuquerque MNL. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife-PE. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009;61(6):1459-62.
31. Aldom JE, Chagla AH. Recovery of *Cryptosporidium* spp. oocysts from water by a membrane filter dissolution method. *Lett Appl Microbiol*. 1995;20(3):186-7.
32. Smith HV, Campbell BM, Paton CA, Nichols RA. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in water concentrates determined by using 4',6'-diamidino-2-phenylindole and immunofluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(1):5198-201.
33. Cantusio-Neto R, Franco RMB. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. *Hig Aliment*. 2004;18(118):52-9.
34. Machado ECL. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife/PE [tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2006.
35. United States Environmental Protection Agency. Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. Washington, DC: Environmental Protection Agency/Office of Water; 2001. 51p. (EPA-821-R-99-061).

36. Fraser RH, Barten PK, Pinney DAK. Predicting stream pathogen loading from livestock using a geographical information system-based delivery model. *J Environ Qual*. 1998;27:935-45.
37. Razzolini MT, da Silva TF, Bastos VK. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* cysts/oocysts in watersheds and drinking water sources in Brazil urban areas. *J Water Health*. 2010;8(2):399-404.
38. United States Environmental Protection Agency. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. Washington, DC: Environmental Protection Agency/Office of Water; 2005. 68p. (EPA-821-R-99-061).
39. Neto RC, dos Santos LU, Sato MI, Franco R.M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, southeast Brazil. *Water Sci Technol*. 2010;62(1):217-22.
40. Santos LU, Cantusio-Neto R, Franco RMB, Guimarães JR. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. *Eng Sanit Ambient*. 2011;16(2):115-20.
41. Araújo RS, Dropa M, Fernandes LN, Carvalho TT, Sato MI, Soares RM, et al. Genotypic characterization of *Cryptosporidium hominis* from water samples in São Paulo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(5):834-8.
42. Branco N, Leal DA, Franco RM. A parasitological survey of natural water springs and in habitants of a tourist city in southeastern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(5):410-7.
43. Sato MI, Galvani AT, Padula JA, Nardocci AC, Lauretto MS, Razzolini MT, et al. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. *Sci Total Environ*. 2013;442:389-96.
44. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 2011.
45. Ministério da Saúde (BR). Boletim Epidemiológico AIDS e DST. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.

**Recebido em: 01/02/2014**

**Aceito em: 16/10/2015**

## CIRURGIAS RECONSTRUTIVAS DA BEXIGA EM PEQUENOS ANIMAIS: INDICAÇÕES E PRINCIPAIS TÉCNICAS\*

Cláudia Valéria Seullner Brandão<sup>1</sup>  
Victor José Vieira Rossetto<sup>1</sup>  
Lídia Mitsuko Matsubara<sup>1</sup>

### RESUMO

As indicações para a cirurgia reparadora da bexiga são inúmeras e abrangem ruptura com laceração tecidual grave, neoplasias, cistites intersticiais crônicas, disfunções neurológicas e anormalidades genitourinárias congênicas. A cistectomia destina-se ao tratamento de diversas dessas afecções. Após a sua realização, a cicatrização tecidual ocorre por meio da combinação de processos dentre os quais, a distensão do tecido remanescente. O alongamento do tecido vesical ocorre em alguns meses desde que excisada a parede da bexiga em até 75% da sua extensão. Nas situações em que a área total removida seja superior a esse valor deve-se recorrer à reconstrução tecidual da bexiga a fim de garantir a complacência vesical. O objetivo da presente revisão de literatura é descrever as principais técnicas para a reconstrução da bexiga, visto sua realização ser cada vez mais requerida na rotina clínica e cirúrgica em Medicina Veterinária após cistectomia subtotal.

**Palavras-chave:** reconstrução tecidual, bioengenharia de tecidos, terapia celular, SIS, bexiga, cães.

## RECONSTRUCTIVE SURGERIES OF BLADDER IN SMALL ANIMALS: INDICATIONS AND MAIN TECHNIQUES

### ABSTRACT

The indications for repairing surgery of the bladder are numerous and incloses rupture with severe tecidual laceration, neoplasmas, chronic interstitial cystitis, neurological disfunctions and congenital abnormatlities. Cystectomy is used to treat many of these conditions. After its execution, the tecidual cicatrization occurs by the combination of process amongst which, the distension of the remainder tissue. The strechtning of the vesical tissue occurs in several months as long as the excised part does not correspond to more than 75% of its extension. When the removed part is bigger than this, the tecidual reconstruction must be proceeded in order to assure the vesical complacence. The aim of the present work is to describe the main techniques for bladder reconstruction, since its execution its growing frequency in the clinical and surgical routine of veterinary medicine after the subtotal cystectomy.

**Keywords:** tecidual reconstruction, bioengineering of tissues, cellular therapy, SIS, bladder, dogs.

---

\* Apoio e financiamento. FAPESP.

<sup>1</sup> Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP-Botucatu. Rubião Junior s/n. Contato principal para correspondência.



## CIRUGÍAS RECONSTRUCTIVAS DE LA VEJIGA EN PEQUEÑOS ANIMALES: INDICACIONES Y PRINCIPALES TÉCNICAS

### RESUMEN

Las indicaciones para la cirugía reconstructiva de vejiga son innumerables y abarcan rupturas con laceración tecidual grave, neoplasias, cistitis intersticiales crónicas, disfunciones neurológicas y anomalías genitourinarias congénitas. La cistotomía se enfoca al tratamiento de varias de esas afecciones. Después de su realización, inicia el proceso de cicatrización tisular en el que se incluye la distensión del tejido remanente. El estiramiento del tejido vesical ocurre durante algunos meses a partir de la excisión de la pared de la vejiga en hasta un 75% de su extensión. En situaciones en que el área total removida sea superior a ese valor se debe recurrir a la reconstrucción tisular de la vejiga con el objetivo de garantizar la complacencia vesical. El objetivo de la presente revisión de literatura es describir las principales técnicas para la reconstrucción vesical, ya que su realización es cada vez más requerida en la rutina clínica y quirúrgica en medicina veterinaria posterior a procedimientos como cistotomía subtotal.

**Palabras clave:** reconstrucción tisular, bioingeniería de tejidos, terapia celular, SIS, vejiga, caninos.

### INTRODUÇÃO

A bexiga consiste em um órgão muscular oco, cuja função é armazenar temporariamente a urina produzida nos rins. Sua localização depende do volume de urina presente, sendo habitualmente encontrada quando vazia no interior do canal pélvico, e quando distendida deslocada cranial e ventralmente para o abdome caudal. Sua posição é frouxamente mantida por ligamentos laterais bilaterais e pelo ligamento ventral médio que conecta a bexiga à sínfise púbica e linha alba (1,2).

A cistotomia e cistectomia consistem nas principais cirurgias envolvendo a bexiga de pequenos animais e destinam-se ao tratamento de diversas afecções vesicais. Após a sua realização, a cicatrização tecidual ocorre em aproximadamente 14 a 21 dias por meio da combinação de processos de regeneração epitelial, síntese e remodelagem do tecido cicatricial, hipertrofia e proliferação da musculatura lisa, e distensão do tecido remanescente (1,2).

Segundo estudos, o alongamento do tecido remanescente ocorre em alguns meses desde que excisada a parede da bexiga em até 75% da sua extensão e preservados o trígono e uretra proximal (1,3). Nas situações em que a área total removida seja superior a esse valor, contudo, deve-se recorrer à reconstrução tecidual da bexiga a fim de garantir a complacência vesical (4-6).

O objetivo da presente revisão de literatura é descrever as principais técnicas para a reconstrução da bexiga, visto sua realização ser cada vez mais requerida na rotina após cistectomia subtotal.

### REVISÃO DE LITERATURA

#### *Indicações*

As indicações para a cirurgia reparadora da bexiga são inúmeras e abrangem ruptura com laceração tecidual grave, neoplasias, cistites intersticiais crônicas, disfunções neurológicas e anomalías genitourinárias congénitas (4-8).

A ruptura com laceração tecidual grave da parede vesical normalmente decorre de traumatismos abdominais físicos contusos ou penetrantes, dentre os quais, são especialmente comuns os acidentes envolvendo veículos automotores. A alta ocorrência de lesões extensas envolvendo a bexiga nesses casos deve-se ainda pela presença concomitante de lesões ortopédicas, como fraturas pélvicas cujos fragmentos ósseos estejam voltados para o interior do canal pélvico (1). Segundo estudo retrospectivo avaliando 155 cães atropelados (9), 16 (10,3%) animais apresentavam ruptura de órgãos ocos, sendo a bexiga o mais acometido.

Nas situações em que o grau de laceração e/ou contusão dos tecidos for excessivo e suspeitando-se de sua viabilidade, é recomendada técnica de reforço da sutura com retalho de serosa de segmento intestinal adjacente ou, a depender da gravidade, outras técnicas reconstrutivas mais avançadas (1).

Em relação às neoplasias de bexiga, diversos autores afirmam que sua incidência em comparação às demais localizações anatômicas, corresponde a aproximadamente 2% de todas as neoplasias no cão. Entretanto, apesar de pouco comum, são de real importância em uma população canina bastante numerosa, agravado sobremaneira devido ao seu difícil e tardio diagnóstico (10,11). Segundo estudo avaliando as neoplasias de bexiga em cães (12), o diagnóstico das neoplasias de bexiga, em especial o carcinoma de células transitórias (CCT), torna-se difícil devido ao fato das células neoplásicas serem muito similares às células transitórias reativas a quaisquer outros processos inflamatórios.

O CCT consiste na neoplasia de bexiga mais rotineiramente observada em cães, porém outros tipos de tumores vesicais menos comuns também têm sido descritos, como carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma indiferenciado, papiloma, fibroma, rabdomiossarcoma, pseudotumores inflamatórios e outros tumores mesenquimais (2,10,12).

No que diz respeito à ressecção de tumores envolvendo grandes extensões da parede vesical, a técnica de cistectomia radical se faz imprescindível para a obtenção de margens livres e melhor prognóstico ao paciente (13). Entretanto, apesar da técnica de cistectomia ser eficiente, a utilização de enxertos é necessária em diversas situações para a otimização dos resultados (14).

Adicionalmente, a ressecção de porções da bexiga pode ser requerida, embora em menor frequência, nos casos de necrose secundária a cistites graves e crônicas de etiologia variada. Segundo estudos anteriores, as infecções bacterianas ocorrem mais comumente em cães do que em gatos (15); já nestes, a etiologia tende a ser multifatorial e de natureza indeterminada, sendo os termos doença do trato urinário inferior dos felinos e cistite idiopática felina, os mais empregados atualmente (16). De acordo com Wouters et al. (17), avaliando 13 gatos com cistite idiopática felina, em quatro animais foi verificado desnudamento focal ou difuso da mucosa e, em um caso, cistite transmural difusa crônica.

Entretanto, tanto nas cistites bacterianas em cães quanto nas idiopáticas em gatos, estão presentes lesões da parede vesical que podem levar à recidiva ou reinfecção do trato urinário e, mediante ausência de resposta ao tratamento clínico, podem ser passíveis de remoção cirúrgica e reconstrução tecidual (4,6,15,16).

Em relação às disfunções neurológicas do trato urinário inferior, a cirurgia reparadora da bexiga permite melhora na qualidade de vida dos pacientes com atonia do músculo detrusor secundária a afecções envolvendo o sistema nervoso central, uma vez que possibilita a restauração da função contrátil da vesícula urinária (7). Além disso, a atonia do músculo detrusor quando não tratada acarreta em incontinência urinária, infecção recorrente do trato urinário e aumento da pressão intravesical, podendo levar à deterioração renal (18). As principais afecções centrais que cursam com distúrbios miccionais incluem a mielodisplasia e lesões da medula espinhal (7).

As anormalidades congênitas quando não diagnosticadas e adequadamente tratadas também podem resultar em infecção e outras lesões do trato urinário, necessitando de reparo cirúrgico e, em casos mais graves, reconstrução tecidual (6).

Entre as principais anormalidades congênitas envolvendo a bexiga incluem-se persistência do úraco e extrofia da bexiga. A primeira consiste na manutenção de um conduto embrionário, resultando em um cisto, seio ou divertículo da parede vesical (1). Já a segunda trata-se de uma má-formação da linha média abdominal e parede ventral da bexiga, ocasionando a eversão desta por defeito abdominal ventral, escoamento de urina e queimaduras (19). Em ambas as situações, e mais impreterivelmente na extrofia da bexiga, faz-se necessária a reconstrução ou substituição da parede vesical (6,19).

## Principais técnicas

### *Enterocistoplastia e gastrocistoplastia*

A reconstrução da bexiga tem sido historicamente realizada desde os primeiros estudos conduzidos por Tizzoni e Foggi (20), os quais substituíram a bexiga de cães, após cistectomia parcial, por segmento ileal interposto entre as porções remanescentes (4,21,22).

A partir de então, as técnicas mais amplamente difundidas consistem na gastrocistoplastia e enterocistoplastia, e caracterizam-se respectivamente pela obtenção de segmentos pediculados da curvatura maior do estômago e de diferentes porções do intestino, sendo o íleo e o cólon os mais empregados (23,24).

Quanto à gastrocistoplastia, Piser et al. (25) descrevem a ressecção de um segmento de antro e fundo estomacal em forma de cunha, com base na curvatura maior e ápice, próximo à curvatura menor, preservando-se o pedículo vascular formado pela artéria gastroepiplóica, a fim de reconstruir parte da parede vesical previamente ressecionada (26) (Fig. 1).

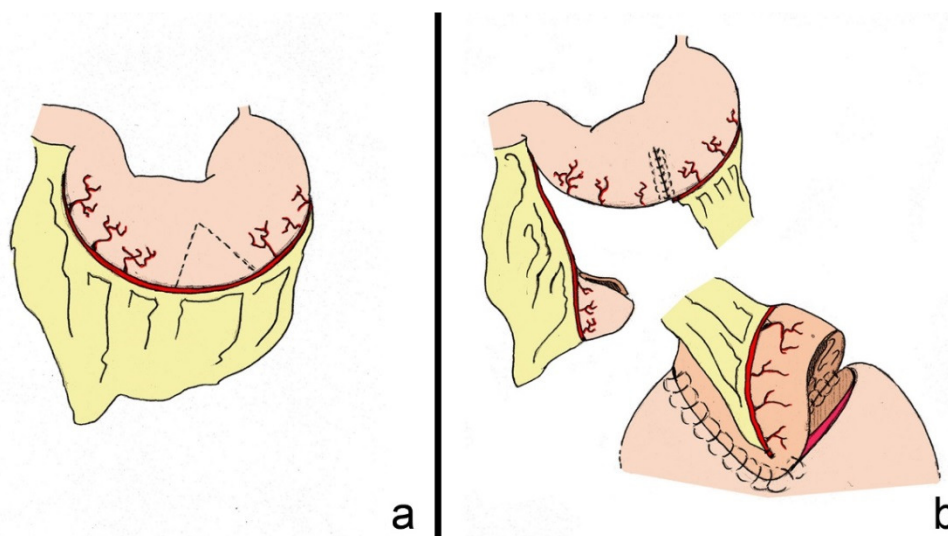


Figura 1. Gastrocistoplastia. a) Ressecção de um segmento pediculado em cunha, localizado em região do corpo do estômago. b) Suturas das porções remanescentes do estômago e do segmento do estômago à bexiga previamente submetida à cistectomia parcial. Adaptado de Mitchell e Plaire (26).

Já a enterocistoplastia consiste na utilização de um segmento intestinal com aporte vascular intacto e incisado em sua borda antimesentérica (23) (Fig. 2 a). A mucosa intestinal do segmento obtido pode ser opcionalmente erodida com o auxílio de uma tesoura de Metzembau ou lâmina de bisturi, sendo sua ressecção, contudo, recomendável por resultar numa melhor e mais rápida epiteliação do enxerto (23). Subsequentemente, o segmento intestinal pediculado é suturado à porção remanescente do tecido original, assumindo a

configuração de uma “bolsa” como reservatório (23) (Fig. 2 b, c, d). Nos casos em que se faz necessário, pode-se ainda realizar a reconstrução do óstio ureteral (23,27).

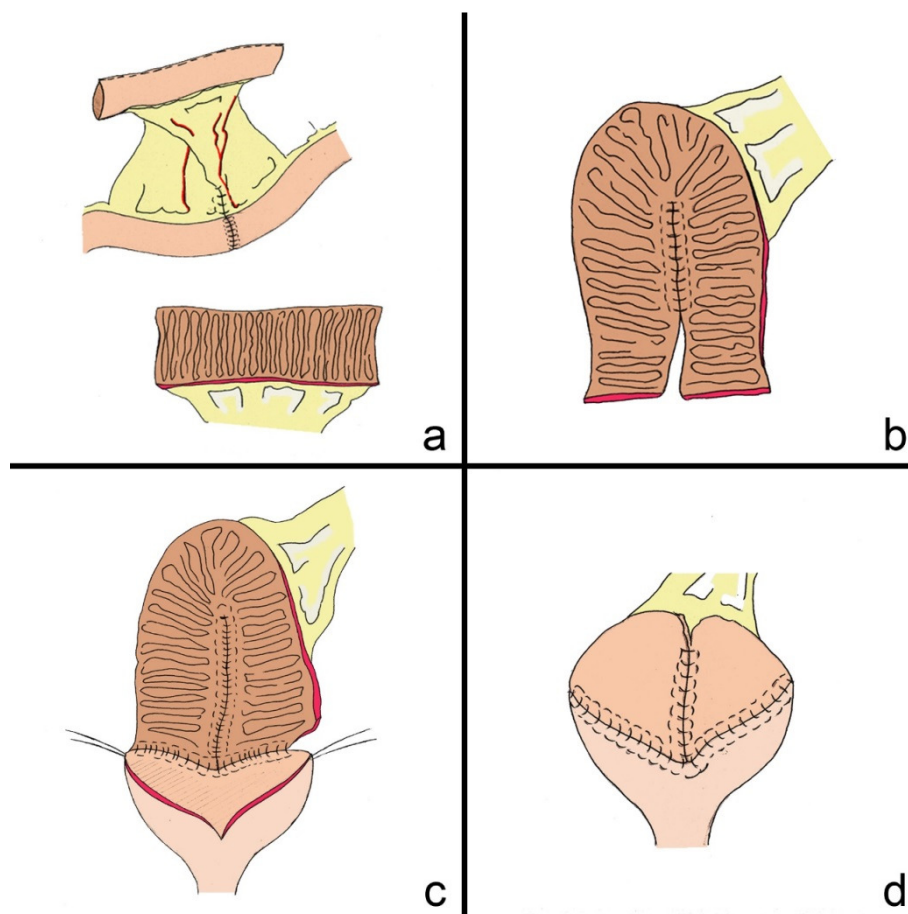


Figura 2. Enterocistoplastia. a) Ressecção de um segmento intestinal pediculado e enteroanastomose. b) sutura intestinal em configuração de bolsa. c) sutura da bolsa à bexiga previamente submetida à cistectomia parcial. d) aspecto final do segmento intestinal suturado à bexiga. Adaptado de Mitchell e Plaire (26).

As principais vantagens que motivaram o uso corrente de segmentos do estômago ou intestino abrangem sua disponibilidade e o reconhecimento biológico. Entretanto, segundo a literatura, esses procedimentos podem resultar em inúmeras complicações, sendo as principais: infecção; obstrução intestinal; anormalidades eletrolíticas; perfuração; produção de muco; e carcinogênese (6,7,28).

As complicações resultantes de contaminação bacteriana são os maiores desafios nas cirurgias reconstrutivas com utilização de segmentos intestinais em humanos. Segundo estudo avaliando o preparo intestinal em pacientes humanos submetidos à enterocistoplastia (29), as complicações infecciosas provenientes de contaminação fecal ocorrem em 18% a 20% dos casos. Quanto à carcinogênese, Gitlin et al. (28) verificaram alterações histológicas que poderiam contribuir para o seu desenvolvimento, como metaplasia glandular e crescimento exagerado de um epitélio transicional hiperplásico nas junções entero e gastrovesicais.

Associada a essas potenciais complicações, a enterocistoplastia não permite o completo esvaziamento vesical por micção normal e demanda tempo cirúrgico significativo (4,30). Já o emprego de segmentos do estômago está relacionado com o desenvolvimento de anemia ferropriva ou megaloblástica, hipoproteinemia, síndrome do estômago curto, esteatorréia e vômitos incoercíveis (21).

### *Cistoplastia com materiais sintéticos*

Muitos são os materiais sintéticos utilizados na reparação de defeitos vesicais após cistectomia ou com o intuito de aumentar a complacência vesical em bexigas retraídas, sendo classificados, de acordo com a sua capacidade de degradação e substituição por tecido original, em não degradáveis ou inabsorvíveis, como polivinil, silicone, politetrafluoroetileno (Teflon) e poliéster (Dacron), e degradáveis ou absorvíveis, como poliglactina e gelatina (4-6,31,32).

Apesar da ampla disponibilidade dos materiais sintéticos, esses e principalmente os não degradáveis, estão relacionados com a ocorrência de inúmeras complicações, incluindo distúrbios metabólicos, perfuração ou extrusão do enxerto, infecção, produção excessiva de muco e formação de urólitos (4,6,33).

Segundo estudo avaliando substitutos uroteliais para a bexiga (4), as complicações verificadas com a utilização de enxertos sintéticos não degradáveis devem-se ao fato desses materiais não possibilitarem a completa reepitelização da bexiga, o que predispõe à incrustação por sais dissolvidos na urina e infecção de difícil erradicação. Rohrmann et al. (34) avaliando reservatórios de silicone na substituição da bexiga em cinco ovinos, referem a ocorrência de infecção em três animais (60%). O tempo médio de sobrevivência, entretanto, foi de 348 dias e os autores não verificaram a presença de incrustação nos componentes prostéticos utilizados.

Em relação à extrusão do material sintético, Ashkar e Heller (33), utilizando enxerto de silicone, referem manutenção do posicionamento do mesmo até a ocorrência de infecção, quando então o material foi deslocado para o lúmen vesical. Segundo O'Sullivan e Barrett (4), a extrusão do material também é passível de ocorrer com enxertos de politetrafluoroetileno e poliéster, e resultaria do crescimento da mucosa abaixo do enxerto implantado.

As complicações supramencionadas, contudo, são menos usualmente verificadas com a utilização dos materiais sintéticos degradáveis, visto esses serem reabsorvidos ou incorporados como arcabouço durante o processo de reparação tecidual (4,35,36). Segundo Know et al. (30), avaliando oito cães submetidos à cistectomia parcial seguida por reparação da bexiga utilizando enxerto de poliglactina acelular e associado a células uroteliais e musculares autólogas, verificaram à histologia, em ambos os grupos, morfologia próxima ao normal após seis meses da cirurgia. Além disso, não foram observadas complicações sistêmicas durante todo o período de avaliação.

Já Youssef et al. (37), utilizando enxerto de poliglactina após cistectomia em ratos, verificaram boa reparação da parede vesical associada à ocorrência de urolitíase secundária à infecção urinária em três (15%) dos 20 animais avaliados. Monsour et al. (38), em estudo similar avaliando a reparação da bexiga de ratos com enxerto de poliglactina, verificaram como principal complicação a substituição do enxerto de poliglactina por tecido cicatricial.

De acordo com O'Sullivan e Barrett (4) e mais recentemente Zhang et al. (39), a diminuição da capacidade contrátil da bexiga secundária à deposição de um tecido cicatricial e consequente contratatura do enxerto seria uma das principais complicações atribuídas ao emprego dos materiais sintéticos degradáveis (4,39).

### *Cistoplastia com materiais naturais*

Os materiais naturais têm sido amplamente utilizados tanto em estudos experimentais quanto em pacientes com alguma disfunção gastrointestinal que inviabilize as técnicas de gastro ou enterocistoplastia (35,40). Dentre os diferentes materiais naturais utilizados na reconstrução da bexiga podem-se citar o emprego de membranas placentárias e de pericárdio eqüino ou bovino (41,42). Segundo estudo avaliando a reparação da bexiga utilizando pericárdio bovino (40), a utilização desses materiais seria indicada por não apresentarem as

complicações descritas previamente com o uso dos segmentos gastrointestinais e atuarem como suporte para a adesão, migração e proliferação celular.

Andretto et al. (41), utilizando fragmentos de pericárdio equino com dimensões de 6 cm x 4 cm na reparação de bexiga de 22 cães, verificaram completo revestimento epitelial do enxerto após aproximadamente quatro meses, e ausência de complicações clínicas, como urolitíase ou inflamação. O exame do sedimento urinário não apresentou alterações importantes e a urografia excretora permitiu visibilizar boa integridade anatômica com a porção vesical remanescente. Resultados semelhantes também foram observados por Kambic et al. (43), avaliando 10 cães após 2,5 anos da realização de cistoplastia com enxerto pericárdico. De acordo com os estudos, o exame histológico revelou completa reepitelização da superfície do enxerto sem a presença de irregularidades nas linhas de sutura. Entretanto, foi verificada ausência da camada muscular no ápice da bexiga, mas que não interferiu negativamente na avaliação urodinâmica.

Apesar de não verificada nos estudos supracitados, Kropp e Cheng (7), contudo, relatam que a exposição crônica desses biomateriais à urina poderia levar a formação de cicatrizes na parede vesical e, em conseqüência disso sua utilização clínica seria limitada. Com a finalidade de identificar um material biodegradável com menor potencial reativo, outros estudos foram conduzidos utilizando matrizes extracelulares à base de colágeno (7,44,45).

As matrizes extracelulares têm sido utilizadas para a reconstrução de diversos tecidos e órgãos, sendo empregadas em cirurgia urológica desde a década de 1990 (46). Tais matrizes são provenientes de tecidos animais, confeccionadas por meio de tratamentos físico, químico e/ou enzimático que visam romper as membranas extracelulares e extrair as membranas celulares internas remanescentes (46,47). O resultado desse processo de descelularização é a formação de uma rede ultraestrutural de fibras colágenas que, assim como os materiais orgânicos descritos acima, atuam como substrato para a adesão e proliferação celulares, porém de limitado potencial antigênico, uma vez que não possuem células em sua constituição (48).

O crescimento e a diferenciação celulares são ainda subsidiados pela presença de diversas outras proteínas estruturais entremeadas às fibras de colágeno, além de fatores de crescimento, citocinas e glicoproteínas resistentes ao processo de descelularização (7,21,46,48,49).

A obtenção de um substrato que favorecesse a adesão e proliferação celulares aliada ao limitado potencial antigênico das matrizes extracelulares propiciaram diversos estudos no âmbito da cirurgia urológica envolvendo a utilização principalmente da submucosa intestinal suína (SIS) (7). A SIS é uma matriz extracelular elaborada por meio da remoção mecânica das camadas mucosa, serosa e muscular do intestino delgado de suínos seguida de descelularização por tratamentos diversos (7,44) (Fig. 3).

Kropp et al. (44), avaliando 19 cães após 15 meses da cistectomia de 35-45% da bexiga e cistoplastia imediata com SIS, não verificaram a ocorrência de rejeição ou quaisquer outras complicações locais e sistêmicas. Greca et al. (21), em estudo avaliando a SIS como alternativa para o aumento da capacidade vesical em oito cães também não observaram a ocorrência de seroma, hematoma, abscesso, fístula, deiscência, aderências e litíase. Adicionalmente, segundo ambos os estudos, a SIS permitiu a proliferação do urotélio e tecidos conjuntivo e vascular sobre o enxerto mesmo já aos 30 dias de pós-operatório. Kropp et al. (44), descrevem ainda a ocorrência das três camadas histológicas (mucosa, muscular e serosa), porém, com perdas da organização e arquitetura normal da camada muscular em algumas regiões.



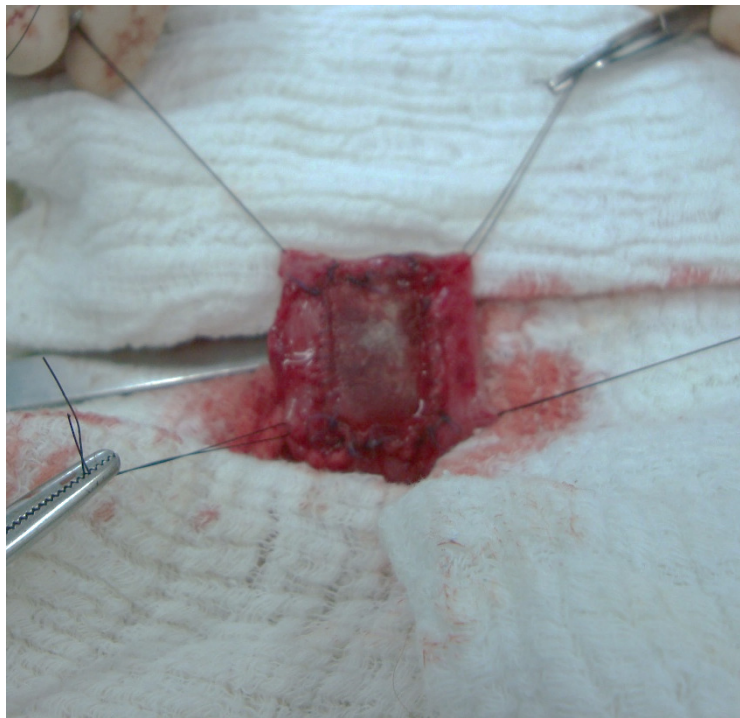


Figura 3. Implante da membrana SIS em bexiga de cão. Note a colocação de suturas em padrão simples contínuo entre as bordas da membrana e a bexiga.

Dentre as demais matrizes extracelulares utilizadas na reparação vesical podem-se citar as derivadas de tecidos como derme e bexiga, normalmente de origem suína, sendo a última também denominada BSM (Bladder Submucosal Matrix) (34,35,46). Assim como a SIS, são constituídas basicamente por colágeno, porém podem diferir quanto aos tipos predominantes. De acordo com Davis et al. (46), a SIS é constituída principalmente por colágeno do tipo I, enquanto que a BSM apresenta proporcionalmente maiores quantidades de colágeno dos tipos III, IV e VI.

Entretanto, apesar das diferenças moleculares, estudos experimentais e clínicos com as diversas matrizes extracelulares têm apresentado em geral resultados semelhantes (36,46). Probst et al. (50), avaliando sete cães submetidos à cistoplastia com BSM homóloga, verificaram à histologia invasão de células uroepiteliais já aos 30 dias de pós-operatório com completa reparação das áreas periféricas aos sete meses. Poucas células inflamatórias mononucleares foram verificadas após 30 dias da cirurgia.

Apesar dos resultados promissores, Know et al. (30), no estudo supracitado, verificaram que os enxertos acelulares induziram acentuada reação do tipo corpo estranho quando comparados aos implantados com células. Davis et al. (46), sugerem que a presença de resquícios de DNA suíno nas matrizes extracelulares sejam os responsáveis pela acentuada reação inflamatória. Em concordância Badylak (35) também infere que agentes foto-oxidantes e químicos, empregados no processo de descélularização, possam estar envolvidos e diante da especulação, a principal recomendação da maioria dos autores tem sido avaliar a real segurança desses materiais por meio de estudos prospectivos longos. A associação desses materiais a técnicas de cultivo celular, abordadas a seguir, constitui outra opção para evitar ou minimizar essa e demais potenciais complicações.

### ***Terapia celular***

Visando aprimorar os resultados obtidos com o uso de matrizes extracelulares e outros materiais sintéticos degradáveis, a bioengenharia com base na terapia celular tornou-se uma

alternativa à reparação da bexiga (51). O emprego de células, selecionadas e transplantadas em diferentes materiais, permite a substituição parcial ou total de órgãos lesados ou degenerados (5). No que se refere à cirurgia urológica, a utilização de células uroepiteliais e musculares lisas possibilitou a reparação anatômica e funcional da bexiga (30,45,51). Da mesma maneira, Yoo et al. (52), avaliando a reparação uretral por meio do uso de enxertos biodegradáveis semeados com células uroepiteliais e musculares, constataram que a transplantação das células foi efetiva no retorno à função tecidual.

Adicionalmente, o uso de células em enxertos previne a formação de contraturas e a sua reabsorção, uma vez que a ocorrência de processo inflamatório exacerbado, induzido pelo contato prolongado de urina com o enxerto desnudo, ou seja, sem a cobertura celular, seria o responsável pela sua reabsorção (5,45,53).

As diferentes fontes celulares utilizadas na engenharia de tecidos possuem suas vantagens e inconvenientes. As células autólogas utilizadas na reparação tecidual da bexiga podem ser obtidas de biópsias cirúrgicas da bexiga, ureter e pelve renal do paciente a ser beneficiado com a terapia celular (5,54). Zhang et al. (54) descrevem ainda a obtenção de células autólogas viáveis a partir da própria urina. A obtenção de células autólogas em pacientes com lesões neoplásicas, contudo, torna a segurança do procedimento bastante questionável (54,55).

Já as células homólogas podem ser obtidas de tecidos cadavéricos e consistem em uma alternativa para a reparação de tecidos lesados, uma vez que possuem as mesmas características das células autólogas, incluindo a sua capacidade de se auto-replicarem (56). Segundo Wakitani et al. (57), as células homólogas quando expandidas *in vitro* possuem também potencial imunogênico reduzido e podem ser utilizadas com segurança no reparo de lesões em diferentes tecidos.

As células podem ainda ser provenientes de outras fontes, como a medula óssea e embriões (54,58). Nesses casos, as células são pluripotentes e normalmente necessitam ser diferenciadas em condições específicas para cada tipo celular desejado (8,54,58).

Para o alcance de sucesso utilizando-se células, contudo, faz-se necessária a semeadura dessas sobre superfícies que contenham propriedades adequadas para adesão, sobrevivência, diferenciação e interação com outras células também transplantadas e do tecido circunvizinho (5,32). De acordo com a literatura, as matrizes acelulares originadas de tecidos de mamíferos possuem tais características (54,59).

Estudos utilizando a SIS semeada com células uroepiteliais e/ou musculares lisas na reparação da bexiga apresentaram resultados favoráveis ao seu emprego (45,60). Segundo Zhang et al. (60), avaliando a reparação tecidual da bexiga de cães com células uroepiteliais e musculares *versus* células da medula óssea, semeadas na SIS, verificaram excelente expansão do enxerto e manutenção do formato da bexiga em aproximadamente 33% (2/6) dos cães submetidos à cistoplastia com enxerto semeado com células. Paralelamente, os enxertos acelulares apresentaram falhas na organização das fibras musculares que permaneceram localizadas apenas na transição entre o enxerto e o tecido nativo, bem como retração moderada do enxerto, urolitíase e a formação de áreas de calcificação distrófica.

Já no estudo conduzido por Yoo et al. (31), avaliando 10 cães da raça beagle, não foram observadas diferenças histopatológicas entre as bexigas neoformadas com enxerto acelular e com células uroepiteliais e musculares. A capacidade vesical, porém apresentou maior aumento nas bexigas reconstruídas com enxertos semeados com células.

Nesse contexto, as células musculares são importantes para a manutenção da integridade estrutural e organização celular do enxerto (5,45,59). Enxertos que não são semeados com células musculares apresentam falha de reepitelização e complicações, pois apesar do epitélio possuir uma alta capacidade regenerativa, são as células musculares que de alguma maneira ordenam a proliferação celular (5,45).



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inúmeras são as disfunções da bexiga que necessitam de tratamento cirúrgico e mais especificamente, de cirurgias reparadoras. Diversas técnicas foram desenvolvidas ao longo da História, muitas inclusive com resultados satisfatórios. Contudo, as complicações inerentes a essas técnicas limitam suas aplicações clínicas ou simplesmente restringem-nas ao campo experimental.

Em razão disso, fez-se necessária a busca por novas técnicas utilizando materiais prostéticos ou naturais que proporcionassem a formação de um tecido de reparação com qualidade e função semelhantes ao tecido vesical original, e que cursassem com menor ocorrência de complicações.

É nesse contexto que surgiram novas técnicas envolvendo a utilização de matrizes extracelulares associadas à terapia celular. A obtenção de um substrato que favorecesse a adesão e proliferação celulares aliado ao reduzido potencial antigênico das matrizes extracelulares permitiu que a bioengenharia com base na terapia celular se tornasse uma alternativa à substituição parcial ou total de órgãos lesados ou degenerados, e constituísse um verdadeiro norte para as pesquisas recentes nas áreas de cirurgias reconstrutiva e urológica em Medicina e Medicina Veterinária.

A realização de ensaios clínicos empregando células às matrizes extracelulares, contudo, ainda é bastante insipiente, o que torna novos estudos necessários para elucidar os mecanismos de interação entre as células e as diferentes matrizes extracelulares e, principalmente, entre as células implantadas e as nativas. Dessa forma, acredita-se que seja possível instituir o material ideal e minimizar as potenciais complicações advindas das cirurgias reparadoras da bexiga, tornando-as em fim opções realmente factíveis e amplamente disponíveis.

## REFERÊNCIAS

1. Waldron DR. Bexiga. In: Slatter D. Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. 3a ed. Barueri: Manole; 2003. p.1629-37.
2. Macphail CM. Surgery of the bladder and urethra. In: Fossum TW, Dewey CW, Horn CV, Johnson AL, Macphail CM, Radlinsky MG, et al. Small Animal Surgery. 4th ed. St. Louis: Elsevier Mosby; 2013. p.735-79.
3. Saito M, Yoshikawa Y, Ohmura M, Yokoi K, Kondo A. Functional restoration of rat bladder after subtotal cystectomy: in vivo cystometry and in vivo study of whole bladder. Urol Res. 1996;24:171-5.
4. O'Sullivan D, Barrett DM. Urothelial substitutes: bladder. J Endourol. 1993;7:423-5.
5. Atala A. Tissue engineering of artificial organs. J Endourol. 2000;14:49-57.
6. Danielsson C, Ruault S, Basset-Dardare A, Frey P. Modified collagen fleece, a scaffold for transplantation of human bladder smooth muscle cells. Biomaterials. 2006;27:1054-60.
7. Kropp BP, Cheng EY. Bioengineering organs using small intestinal submucosa scaffolds: in vivo tissue-engineering technology. J Endourol. 2000;14:59-62.
8. Koh CJ, Delo DM, Lee JW, Siddiqui MM, Lanza RP, Soker S, et al. Parthenogenesis-derived multipotent stem cells adapted for tissue engineering applications. Methods. 2009;47:90-7.

9. Figuera RA, Da Silva MC, Souza TM. Pathological aspects of 155 fatal cases of dogs victimized by motor vehicles accidents. *Cienc Rural*. 2008;38:1375-80.
10. Knapp DW. Tumors of the Urinary System. In: Withrow SJ, MacEwen EG. *Small Animal Clinical Oncology*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2001. p.490-9.
11. Henry CJ. Transitional Cell Carcinoma. In: *Proceedings of the 32 World Small Animal Veterinary Association*; 2007; Sydney, Australia. Sydney: WSAVA; 2007.
12. Chun R. Canine bladder tumors: beyond piroxicam. In: *Proceedings of the North American Veterinary Conference*; 2006; Orlando, USA. Orlando: NAVC; 2006. p.7-11.
13. Rossetto VJV, Brandão CVS, Ranzani JJT, Pavan PT, Mamprim MJ, Amorim RL, et al. Radical exeresis of bladder transitional cell carcinoma in dog: survival superior to two years. *Vet Zootec*. 2009;16:321-4.
14. Figueiredo JAD. *Cistoplastias em cães – revisão de literatura [dissertação]*. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.
15. Nelson RW, Couto CG. Infecções do trato urinário. In: Nelson RW, Couto CG. *Fundamentos de medicina interna de pequenos animais*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p.364-8.
16. Reche Junior A, Hagiwara MK. Similarities between the feline idiopathic lower urinary tract disease and human interstitial cystitis. *Cienc Rural*. 2004;34:315-21.
17. Wounters F, De Barros CSL, Wounters ATB, Kommers GD. Feline Urologic Syndrome: 13 cases. *Cienc Rural*. 1998;28:497-500.
18. Lorenz MD, Kornegay JN. Disorders of micturition. In: Lorenz MD, Kornegay JN. *Handbook of veterinary neurology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2006. p.75-90.
19. Ader PL, Hobson HP. Exstrophy of the bladder in a dog. *JAAHA*. 1978;15:103-7.
20. Tizzoni G, Foggi A. Die Wiederherstellung der Harnblas Experimentelle Untersuchungen. *Zent Bl Chir*. 1888;15:921-6.
21. Greca FH, Sousa Filho ZA, Silva APG, Leonel IS, Soccol AT, Feres AN, et al. The use of porcine small intestine submucosa as a graft for urinary bladder augmentation in dogs. *Acta Cir Bras*. 2004;19:670-6.
22. Rigaud J, Le Normand L. Augmentation enterocystoplasty. *Ann Urol*. 2004;38:298-310.
23. Schwarz PD, Egger EL, Klause SE. Modified “cut-patch” ileocystoplasty for urinary bladder reconstruction in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. 1991;198:273-7.
24. Ueno K, Yamanaka N, Kimura K, Arakawa S, Kamidono S, Sara I. Bladder reconstruction with autotransplanted ileum in the dog: better functional results than standard enterocystoplasty. *BJU Int*. 2001;87:703-7.
25. Piser JA, Mitchell ME, Kulb TB, Rink RC, Kennedy HA, McNulty A. Gastrocystoplasty and colcystoplasty in canines: the metabolic consequences of acute saline and acid loading. *J Urol*. 1987;138:1009-13.

26. Mitchell ME, Plaire JC. Augmentation cystoplasty. In: Gillenwater JY, Grayback JT, Howards SS, Mitchell ME. Adult and pediatric urology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002. p.2245.
27. Kristjarsson A, Abol-Enein H, Alm P, Mokhtar AA, Ghoneim MA, Månsson W. Long-term renal morphology and function following enterocystoplasty (refluxing or anti-reflux anastomosis): an experimental study. *Br J Urol.* 1996;78:840-6.
28. Gitlin JS, Wu X, Sun T, Ritchey ML, Shapiro E. New concepts of histological changes in experimental augmentation cystoplasty: insights into the development of neoplastic transformation at the enterovesical and gastrovesical anastomosis. *J Urol.* 1999;162:1096-100.
29. Massetti FM, Manzano JP, Paiva CS, Couto L, Utida C, Andreoni C, et al. Preparo intestinal para cistectomia radical. Vale a pena? *Rev Bras Med.* 2011;1:4-5.
30. Kwon T, Yoo J, Atala A. Local and systemic effects of a tissue engineered neobladder in a canine cystoplasty model. *J Urol.* 2008;179:2035-41.
31. Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology.* 1998;51:221-5.
32. Cunha JR AG. Estudo morfológico de nova mucosa intestinal formada sobre retalho homólogo de matriz acelular. Modelo experimental em ratos [dissertação]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; 2006.
33. Ashkar L, Heller E. The silastic bladder patch. *J Urol.* 1967;98:679-83.
34. Rohrman D, Albrecht D, Hannappel J, Gerlach R, Schwarzkopp G, Lutzeyer W. Alloplastic replacement of the urinary bladder. *J Urol.* 1996;156:2094-7.
35. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol.* 2004;12:367-77.
36. Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol.* 2008;18:2-9.
37. Youssef D, Chopin D, Leandri J, Auvert J, Loisançe D, Abbou C. Cystoplasty using a resorbable polyglactin prosthesis covered by a free peritoneal flap. *Ann Urol.* 1988;22:263-7.
38. Monsour MJ, Mohammed R, Gorham SD, French DA, Scott R. An assessment of a collagen/vicryl composite membrane to repair defects of the urinary bladder in rabbits. *Urol Res.* 1987;15:235-8.
39. Zhang Y, Frimberger D, Cheng EY, Lin H, Kropp BP. Challenges in a larger bladder replacement with cell-seeded and unseeded small intestinal submucosa grafts in a subtotal cystectomy model. *BJU Int.* 2006;98:1100-5.
40. Moon SJ, Kim DH, Jo JK, Chung JH, Lee JY, Park SY, et al. Bladder reconstruction using bovine pericardium in a case of enterovesical fistula. *Korean J Urol.* 2011;52:150-3.

41. Andretto R, Gonzales J, Neto JG, Miranda JF, Antunes AM. Experimental cystoplasty in dogs using preserved equine pericardium. *Rev Assoc Med Bras.* 1981;27:153-4.
42. Fishman IJ, Flores FN, Scott B, Spjut HJ, Morrow B. Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. *J Urol.* 1987;138:1291-4.
43. Kambic H, Kay R, Chen JF, Matsushita M, Harasaki H, Zilber S. Biodegradable pericardial implants for bladder augmentation: a 2.5 year study in dogs. *J Urol.* 1992;148:539-43.
44. Kropp BP, Rippey MK, Badylak SF, Adams MC, Keating MA, Rink RC, et al. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations. *J Urol.* 1996;155:2098-104.
45. Rossetto VJV, Mota LSLS, Rocha NS, Miot HA, Grandi F, Brandão CVS. Grafts of porcine small intestinal submucosa seeded with cultured homologous smooth muscle cells for bladder repair in dogs. *Acta Vet Scand.* 2013;55:1-6.
46. Davis NF, McGuire BB, Callanan A, Flood HD, Mcgloughlin TM. Xenogenic extracellular matrices as potential biomaterials for interposition graftin in urological surgery. *J Urol.* 2010;184:2246-53.
47. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006;27:3675-83.
48. Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Kraine MR, Waisner B, Badylak SF. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem.* 1996;67:478-91.
49. Yamada KM, Paukov R, Cukierman E. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36:959-66.
50. Probst M, Piechota HJ, Dahiya R, Tanagho EA. Homologous bladder augmentation in dog with the bladder acellular matrix graft. *BJU Int.* 2000;85:362-71.
51. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet.* 2006;367:1241-6.
52. Yoo J, Satar N, Retik AB, Atala A. Ureteral replacement using biodegradable polymer scaffolds seeded with urothelial and smooth muscle cells. *J Urol.* 1995;153:375.
53. Cheng F, Yoo J, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair. *Urology.* 1999;54:407-10.
54. Zhang Y, Mcneill E, Tian H, Soker S, Andersson K, Yoo JJ. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J Urol.* 2008;180:2226-33.
55. Yiang Z, Guomin W. Allogeneic stem cells seeded tissue engineered bladder: a possible alternative for bladder reconstruction and treatment to bladder cancer. *Med Hypotheses.* 2008;70:294-7.

56. Alvez PMM, Carrondo MJT, Cruz PE. Introdução à tecnologia de cultivo em células animais. In: Moraes AM, Augusto EFR, Castilho LR. Tecnologia do cultivo de células animais. 1a ed. São Paulo: Roca; 2009. p.2-12.
57. Wakitani S, Kawaguchi A, Tokuhara Y, Takaoka K. Present status of and future direction for articular cartilage repair. *J Bone Miner Metab.* 2008;26:115-22.
58. Xiong X, Fukuoka KG, Ebihara Y, Salm S, Coetzee S, Ontiveros C, et al. Bone marrow cells are able to generate prostatic epithelial and stromal Cells. *J Urol.* 2009;181:41-2.
59. Eberli D, Filho LF, Atala A, Yoo JJ. Composite scaffolds for the engineering of hollow organs and tissues. *Methods.* 2009;47:109-15.
60. Zhang Y, Lin H, 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;96:1120-5.

**Recebido em: 22/01/2015**

**Aceito em: 04/11/2015**

**ADENOCARCINOMA PULMONAR EM VACA NELORE: RELATO DE CASO**

Bianca Paola Santarosa<sup>1</sup>  
Gabriela Nascimento Dantas<sup>1</sup>  
Noeme Sousa Rocha<sup>2</sup>  
Celso Antonio Rodrigues<sup>3</sup>  
Simone Biagio Chiacchio<sup>4</sup>  
José Paes Oliveira-Filho<sup>1</sup>  
Rogério Martins Amorim<sup>4</sup>  
Roberto Calderon Gonçalves<sup>4</sup>

**RESUMO**

Neoplasias pulmonares são consideradas raras em bovinos. Este relato descreve um caso de adenocarcinoma pulmonar em vaca Nelore atendida na Clínica de Grandes Animais da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. O animal apresentava anorexia, atonia ruminal, tosse e crepitação fina e aumento dos ruídos traqueobrônquico e broncobronquiolar à auscultação de ambos os pulmões. Pelo emagrecimento progressivo, procedeu-se o teste de tuberculina pelo teste duplo comparativo e o resultado foi negativo. Diante do diagnóstico inconclusivo dos achados clínicos e exames laboratoriais, realizou-se laparotomia exploratória, e suspeitou-se de mesotelioma. Porém, pelo mau prognóstico, decidiu-se a eutanásia do animal. Na necropsia havia nódulos de dimensões variadas principalmente em serosa parietal e visceral do baço, e no parênquima pulmonar. No exame histopatológico, constatou-se neoplasia epitelial formando ácinos, com pleomorfismo nuclear acentuado e alta relação núcleo:citoplasma. A imuno-histoquímica foi positiva para as células neoplásicas, sendo ela citoplasmática e difusa (Citoqueratina A1/E1). O diagnóstico de neoplasia pulmonar deve ser considerado em bovinos com idade avançada e/ou histórico e sinais clínicos de inapetência e emagrecimento progressivo, especialmente quando associado a sinais clínicos relacionados ao aparelho respiratório.

**Palavras-chave:** anorexia, bovinos, emagrecimento progressivo, neoplasia, pulmão.

**PULMONARY ADENOCARCINOMA IN NELORE COW: CASE REPORT****ABSTRACT**

Lung neoplasms are considered rare in cattle. This report describes a case of pulmonary adenocarcinoma in a Nelore cow treated in the Large Animal Internal Medicine of FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. The animal had anorexia, no rumen movements, coughing and thin crackling noises and increased tracheobronchial and bronchobronchiolar in the auscultation of both lungs. Because of progressive weight loss, the comparative tuberculin double test was proceeded, but the result was negative. Given the inconclusive diagnosis of clinical findings and laboratory tests, exploratory laparotomy was performed, and the suspicion of mesothelioma. However, due to poor prognosis, it was decided to euthanize the animal. Gross lesions were nodules of various sizes primarily in the parietal and visceral serous spleen, and lung parenchyma. The histopathological epithelial neoplasia found forming acini, with marked nuclear pleomorphism and high in nucleus: cytoplasm. Immunohistochemistry was

<sup>1</sup> Departamento de Clínica Veterinária FMVZ-UNESP/Botucatu. Contato principal para correspondência

<sup>2</sup> Professora. Departamento de Clínica Veterinária, Área Patologia Veterinária FMVZ-UNESP/Botucatu

<sup>3</sup> Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Área Cirurgia de Grandes Animais FMVZ-UNESP/Botucatu

<sup>4</sup> Professor Departamento de Clínica Veterinária, Área Clínica de Grandes Animais FMVZ-UNESP/Botucatu

positive for neoplastic cells, it is cytoplasmic and diffuse (Cytokeratin A1/E1). The diagnosis of lung neoplasms should be considered in cattle with advanced age and/or historical and clinical signs of inappetence, progressive weight loss, especially when there are clinical signs related to respiratory system.

**Keywords:** anorexia, cattle, lung, neoplasms, progressive weight loss.

## ADENOCARCINOMA PULMONAR EN VACA DE RAZA NELORE: RELATO DEL CASO

### RESUMEN

El cáncer de pulmón se considera raro en el ganado. Este informe describe un caso de adenocarcinoma pulmonar em vaca de la raza Nelore vaca servido en la Clínica de Grandes Animales FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. El animal tenía anorexia, sin movimientos del rumen, tosiendo y creptación fina y aumento en los ruidos traqueobronquiales y en la auscultación de ambos pulmones. Por la pérdida de peso progresiva se procedido a la prueba de la tuberculina la prueba doble comparativa y el resultado fue negativo. Dado el diagnóstico no concluyente de los hallazgos clínicos y pruebas de laboratorio, se realizo laparotomía exploratoria, y era sospechoso de mesotelioma. Sin embargo, el mal pronóstico, se decidió la eutanasia del animal. Durante la necropsia se encontraron nódulos de diversos tamaños, principalmente serosa parietal y visceral del bazo, y el parénquima pulmonar. El examen histopatológico mostró neoplasia epiteliales que forman acinos, con marcado pleomorfismo nuclear y de alta relación núcleo: citoplasma. La inmunohistoquímica fue positiva para células neoplásicas, donde estas eran difusa y citoplasmática (Citoqueratina A1/E1). El diagnóstico de neoplasia de pulmón se debe considerar en el ganado con la edad y/o la historia avanzada y signos clínicos de la pérdida de apetito y pérdida de peso, sobre todo cuando hay signos clínicos relacionados con el sistema respiratorio.

**Palavras chave:** anorexia, ganado, pérdida de peso progresiva, cáncer, pulmón.

### INTRODUÇÃO

Neoplasias pulmonares são consideradas raras em bovinos (1). Anderson e Sandison (2) estudaram a presença de tumores em bovinos em 100 abatedouros na Grã-Bretanha. Nesta pesquisa foram examinados 1,3 milhão de bovinos, e encontraram-se apenas 8,3% (25/302) de tumores primários de pulmão (2). Dentre as neoplasias pulmonares já relatadas nos bovinos estão os blastomas pulmonares (3), o carcinoma de células pequenas e anaplásicas de pulmão (4), os carcinomas bronquíolo-alveolares (5,6), o neoplasma multicêntrico bronquíolo-alveolar (7) e o adenocarcinoma bronquiolar (8) e pulmonar (9,10). Por outro lado, metástase pulmonar também é relatada em bovinos, proveniente de adenocarcinoma uterino, por exemplo (11). Porém, a maioria dos tumores pulmonares encontrados nos bovinos são adenocarcinomas (10). Esses tumores podem ser subdivididos em quatro padrões histológicos distintos: papilar, acinar, sólido e misto, sendo os padrões papilar e acinar, os mais frequentes nos animais domésticos (12).

No Brasil, apenas um relato de adenocarcinoma pulmonar primário em bovino foi descrito por Viott et al. (10). Assim, ainda se faz necessário o estudo do comportamento deste tipo de neoplasia em grandes animais. O objetivo deste trabalho foi descrever os achados clínicos, laboratoriais, necroscópicos e histopatológicos do adenocarcinoma pulmonar em vaca Nelore.

## RELATO DE CASO

O presente relato se refere a uma vaca da raça Nelore, com nove anos de idade, com 440kg de peso vivo (PV), atendida na Clínica Médica de Grandes Animais da FMVZ/UNESP-Botucatu. A queixa principal apresentada pelo proprietário foi apatia, anorexia, emagrecimento progressivo e inquietação há oito dias. Também foram relatadas tosse e fezes escassas e ressecadas há 15 dias. Na propriedade realizou-se tratamento com solução de silicone e óleo de cozinha, via oral, porém sem melhora, e notou-se dificuldade de deglutição. O último parto tinha ocorrido há seis anos, e desde então o animal não foi mais colocado para a reprodução. Ao exame físico a vaca apresentava atonia ruminal, fezes escassas, crepitação fina e aumento dos ruídos traqueobrônquico e broncobronquiolar, bem como propagação do som cardíaco, à auscultação de ambos os pulmões e, sinais de desidratação (8%).

Pelo emagrecimento progressivo procedeu-se ao teste de tuberculina pelo teste duplo comparativo e o resultado foi negativo. No primeiro hemograma havia aumento do volume globular e da proteína plasmática total, confirmando os sinais de desidratação, além de hiperfibrinogemia, neutrofilia e monocitose. O exame do líquido ruminal mostrou odor fétido; pH 8,0; cloreto de 7,3mEq/L; 15 minutos para o Teste de Redução do Azul de Metileno; e protozoários médios e grandes ausentes. No segundo hemograma, feito após quatro dias de internação, havia hiperfibrinogemia, leucopenia com linfopenia e monocitopenia. Como não houve melhora clínica do animal, colheu-se líquido peritoneal para investigar a presença de peritonite e o resultado mostrou coloração amarelada, aspecto turvo, densidade 1.034, (++++), de sangue oculto, coagulação positiva, 4,6g/dL de proteína, 200mg/dL de fibrinogênio, 2.450 hemácias e 2.550 de células nucleadas. A citologia revelou 44% de linfócitos típicos, 32% de neutrófilos segmentados, 23% de mononucleares, 1% de eosinófilos, além de células mesoteliais, raros macrófagos, hemácias livres e íntegras. A partir do quadro clínico de inapetência e atonia ruminal optou-se por laparotomia exploratória. Observaram-se pequenos nódulos no peritônio parietal e visceral, sugestivo de mesotelioma, e por isso amostras destes nódulos foram enviadas para o exame histopatológico. No entanto, o diagnóstico foi inconclusivo. Instituiu-se tratamento suporte e antibioterapia com florfenicol (20mg/kg/PV). Diante da ausência de histórico de vermifugação, aplicou-se levamisol (10,0mg/kg/PV). Devido ao mau prognóstico e da idade do animal, optou-se pela eutanásia.

Na necropsia o animal apresentava bom escore corporal e mucosas ocular e vulvar róseas. A análise da cavidade abdominal revelou nódulos de dimensões variadas (0,2 a 2,0cm de diâmetro) principalmente em serosa parietal e visceral do baço (Fig. 1A). Havia um nódulo de 10 x 8cm que se apresentava envolto por tecido adiposo. Os nódulos apresentavam coloração amarelada a esbranquiçada, de consistência firme, e áreas de aspecto calcificado. Nos pulmões havia áreas de atelectasia associadas à fibrose multifocal, além de nódulos de várias dimensões, com as mesmas características dos demais (Fig. 1B). No abomaso, ulcerações multifocais de tamanhos variados.

Colheram-se fragmentos dos órgãos que foram fixados em solução de formalina tamponada a 10%. Posteriormente, os fragmentos foram incluídos em parafina em cassetes para cortes histológicos de 5µm, em micrótomo, para confecção de lâminas, que foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.) e analisadas em microscópio óptico pelo Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ/UNESP, Botucatu.

A análise histopatológica dos pulmões revelou neoplasia epitelial moderadamente celular, não delimitada, infiltrativa, expansiva, formando ácinos e agrupamentos desorganizados. As células epiteliais exibiram citoplasma discreto a moderado, eosinofílico e vacuolizado discretamente (Fig. 2A). Os núcleos eram arredondados, centrais ou dispostos na porção basal das células e, basofílicos. A cromatina celular era esparsa com um ou mais nucléolos evidentes por célula. Notou-se acentuada anisocariose e anisocitose, assim como



pleomorfismo nuclear acentuado e alta relação núcleo: citoplasma (Fig. 2B). Havia, em média, uma a duas figuras de mitose, por campo de grande aumento (400x). Observou-se ainda quantidade discreta de material amorfo levemente basofílico intra-acinar, áreas de necrose multifocal a coalescente, infiltrado inflamatório mononucleado composto predominantemente por linfócitos, seguido por plasmócitos e discretos macrófagos reativos. Havia também áreas de fibrose e mineralização em quantidade moderada com distribuição multifocal. Observou-se congestão vascular moderada difusa, áreas de enfisema alveolar moderado difuso associado à áreas de atelectasia, onde também havia áreas de hemorragia.

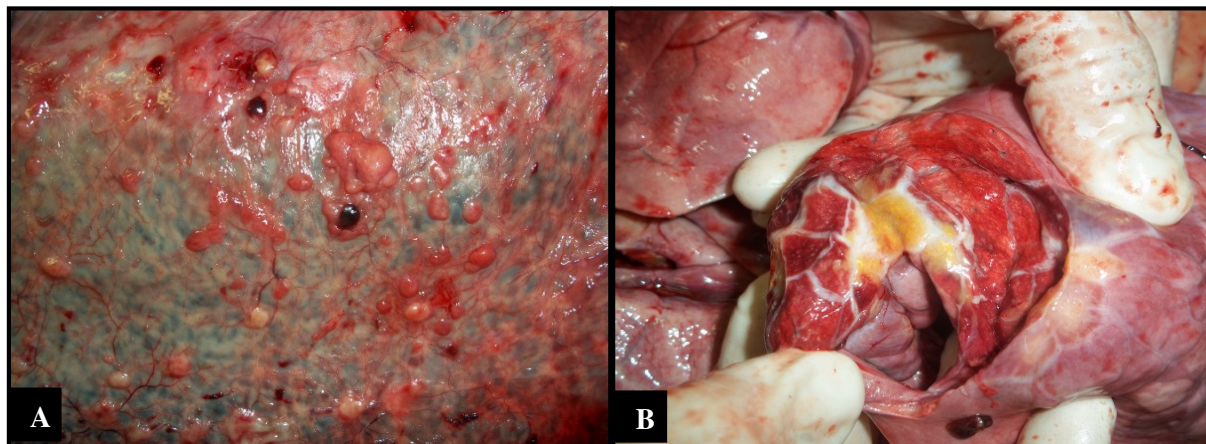


Figura 1. **A)** Baço apresentando vários nódulos na serosa. **B)** Pulmão. Aspecto amarelo esbranquiçado do nódulo ao corte. Serviço de Patologia Veterinária, FMVZ-UNESP/Botucatu.

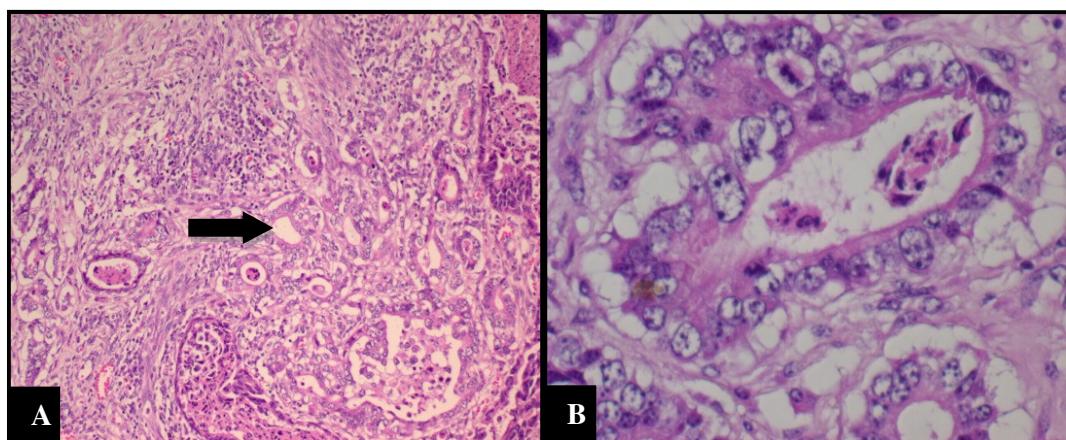


Figura 2. **A)** Pulmão. Neoplasia epitelial formando ácinos (seta). H.E. 10x. **B)** Pulmão. Pleomorfismo nuclear acentuado e alta relação núcleo: citoplasma. H.E. 40x. Serviço de Patologia Veterinária, FMVZ-UNESP/Botucatu.

Embora o teste de tuberculina tivesse resultado negativo, diante da prévia suspeita clínica de tuberculose, e dos achados anatomopatológicos, realizou-se a coloração de Ziehl Neelsen em uma amostra de pulmão, que também foi negativa. Procedeu-se imunohistoquímica e houve reação positiva para Citoqueratina (Fig. 3A) e negativa para Vimentina (Fig. 3B).

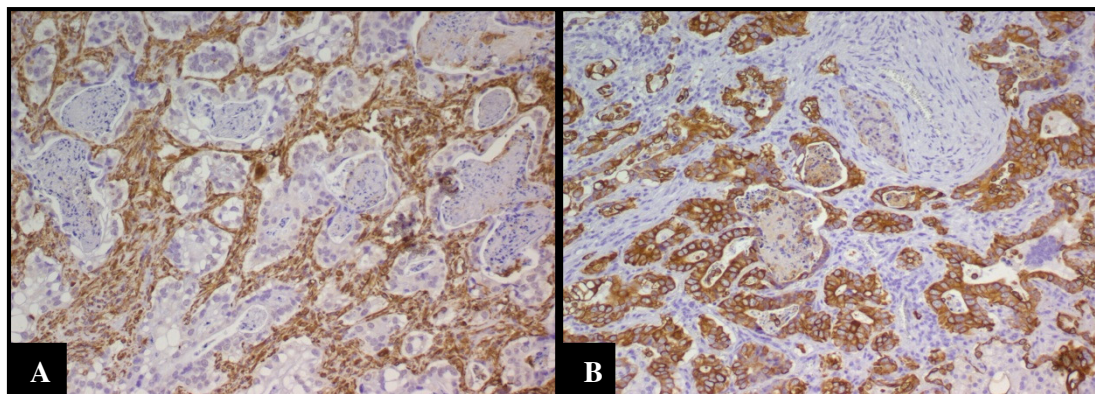


Figura 3. **A)** Pulmão. Citoqueratina A1/E1 (CK A1/E1): imuno-histoquímica positiva para as células neoplásicas, sendo ela citoplasmática e difusa. 10x. **B)** Pulmão. Vimentina: imuno-histoquímica negativa para as células neoplásicas. 10x. Serviço de Patologia Veterinária, FMVZ-UNESP/Botucatu.

A histopatologia do coração, em região subepicárdica, mostrou degeneração hidrópica dos miócitos com distribuição em faixa. Havia também cistos parasitários compatíveis com *Sarcocystis* spp. No fígado observou-se desorganização do arranjo trabecular dos hepatócitos com distribuição difusa, e os hepatócitos exibiram degeneração macrovacuolar. No baço evidenciou-se congestão vascular acentuada difusa associada à hemossiderose moderada. Notou-se ainda, em cápsula esplênica, infiltrado de células neoplásicas, já descritas previamente. No intestino, em região de lâmina própria, havia moderado infiltrado linfocítico difuso e, raros eosinófilos. No linfonodo mesentérico e na massa abdominal e da pelve observou-se infiltrado neoplásico, referente à neoplasia. O diagnóstico final foi de adenocarcinoma pulmonar.

## DISCUSSÃO

Neoplasias pulmonares em bovinos têm pouca importância econômica, porém são achados incidentais em abatedouros (7). Embora tenha sido descrito em bovinos com idade avançada (3,6,11), Sanford e Bundza (7) relataram a ocorrência de neoplasma multicêntrico bronquioalveolar em uma novilha Hereford. Os sinais clínicos de inapetência, tosse, emagrecimento progressivo corroboraram com os descritos por Scarratt et al. (8) em uma vaca de corte e, por Okada et al. (6) e Stiwell e Peleteiro (11), em vacas Holandesas.

Assim como neste relato, Sanford e Bundza (7) e Viott et al. (10) também realizaram a exclusão de diagnósticos diferenciais como tuberculose. Estes autores encontraram resultado negativo para o teste de tuberculina e na coloração de Ziehl-Neelsen da lâmina de um fragmento de pulmão. Apesar de serem geralmente sólidos, os nódulos do adenocarcinoma pulmonar podem apresentar áreas centrais de necrose, que se assemelham com granulomas, macroscopicamente (12). Em seres humanos há relatos de infecção por *Mycobacterium* sp. associados à presença deste tipo de tumor (10).

Adenocarcinomas pulmonares com característica esquistosa, em bovinos, devem ser diferenciados de outras neoplasias epiteliais, principalmente neoplasmas primários de útero e pâncreas (12). Entretanto a ausência de alterações nestes órgãos excluiu esta possibilidade. A cápsula esplênica e os linfonodos estavam afetados neste relato, porém como resultado de metástase. Apesar da constatação da ocorrência de metástase na necropsia, não se notaram nódulos à palpação retal, diferentemente de Stiwell e Peleteiro (11), que observaram vários nódulos firmes no mesentério pela palpação. Estes autores descreveram adenocarcinoma uterino com metástase no mesentério, nos pulmões e fígado.

Durante a laparotomia exploratória suspeitou-se de mesotelioma, no entanto, assim como Viott et al. (10), a neoplasia descrita neste relato foi diferenciada histopatologicamente de mesotelioma epiteloide pela presença de núcleos basais e uniformes das células que formavam os ácinos, o que não acontece nos mesoteliomas, que possuem células granulares com núcleos irregulares e ácinos primitivos. Além disso, a ocorrência de metástases em tecidos linfáticos nos mesoteliomas raramente é citada (12).

A positividade para a técnica de imuno-histoquímica empregada (Citoqueratina A1/E1) auxiliou efetivamente na tipificação da neoplasia. O diagnóstico de neoplasia pulmonar, embora raro, deve ser considerado em bovinos com idade avançada e/ou histórico e sinais clínicos de inapetência e emagrecimento progressivo, especialmente quando associado a sinais clínicos relacionados ao aparelho respiratório.

## REFERÊNCIAS

1. Migaki G, Helmboldct F, Robinsonf R. Primary pulmonary tumors of epithelial origin in cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 1974;35:1397-400.
2. Anderson LJ, Sandison AT. Pulmonary tumors found in a British Abattoir survey: Primary carcinomas in cattle and secondary neoplasms in cattle, sheep and pigs. *Br J Cancer.* 1968;22:47-57.
3. Kelley LC, Puette M, Langheinrich KA, King B. Bovine pulmonary blastomas: histomorphologic description and immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 1994;31:658-62.
4. Piercy DW, Cranwell MP, Wonnacott BJ. Anaplastic small cell carcinoma of the lung in a six-month-old Friesian calf. *Vet Rec.* 1993;132:386-7.
5. Charan K, Pawaiya RV, Katiyar RC. Primary bronchiolo-alveolar adenocarcinoma in a bull. *Vet Rec.* 1996;138:163-4.
6. Okada Y, Ochiai K, Osaki K, Kimura T, Itakura C. Bronchiolar-alveolar carcinoma in a cow. *J Comp Pathol.* 1998;118:69-74.
7. Sanford SE, Bundza A. Multicentric bronchiolo-alveolar neoplasm in a steer. *Vet Pathol.* 1982;19:95-7.
8. Scarratt WK, Sponenberg DP, Collins TJ, Thatcher CD. Bronchiolar adenocarcinoma in a cow. *J Am Vet Med Assoc.* 1984;185:1549-51.
9. Kadota K, Ito K, Kamikawa S. Ultrastructure and origin of adenocarcinomas detected in the lungs of three cows. *J Comp Pathol.* 1986;96:407-14.
10. Viott AM, Langohr IM, Vannucci FA, Almeida AP, Leite RC, Ecco R. Adenocarcinoma pulmonar em um bovino. *Cienc Rural.* 2010;40:484-7.
11. Stilwell G, Peleteiro MC. Uterine Adenocarcinoma with Pulmonary, Liver and Mesentery Metastasis in a Holstein Cow. *Vet Med Int.* 2010;2010:1-3.
12. Wilson DW, Dungworth DL. Tumors of the respiratory tract. In: Meuten DJ. *Tumors in domestic animals.* 4th ed. Ames: Iowa State Press. 2002. p.365-99.

**Recebido em: 29/01/2015**

**Aceito em: 14/10/2015**

## LINFOMA INTRAVASCULAR DE CÉLULAS T EM CÃO

Letícia Batelli de Oliveira<sup>1</sup>  
Juliano Nóbrega<sup>2</sup>  
Renee Laufer-Amorim<sup>2</sup>  
Fabiano José Ferreira de Sant'Ana<sup>3</sup>  
Janildo Ludolf Reis Junior<sup>4</sup>

### RESUMO

Linfoma intravascular (LI) é uma desordem linfoproliferativa rara caracterizada por proliferação intravascular de linfócitos neoplásicos com nenhum ou mínimo envolvimento do parênquima. O sistema nervoso central e a pele são os tecidos mais comumente afetados. O LI de células B é mais frequentemente relatado em comparação com os de origem T. Este trabalho descreve os achados anatomopatológicos e imuno-histoquímicos de um cão com linfoma intravascular de células T em múltiplos órgãos, incluindo encéfalo, fígado, adrenais, rins e estômago.

**Palavras-chave:** neuropatologia, doenças de cães, linfoma intravascular, SNC.

### INTRAVASCULAR T-CELL LYMPHOMA IN DOG

#### ABSTRACT

Intravascular lymphoma (IL) is a rare lymphoproliferative disorder characterized by intravascular proliferation of neoplastic lymphoid cells with minimal or no involvement of organs parenchyma. The central nervous system and skin are the most commonly affected tissues. B-cell IL is more frequently reported when compared with T-cell IL. This report describes the immunohistochemistry and anatomic pathology findings of a dog with intravascular T-cell lymphoma in multiple organs, including brain, liver, adrenal glands, kidneys, and stomach.

**Keywords:** neuropathology, diseases of dogs, intravascular lymphoma, CNS.

### LINFOMA INTRAVASCULAR DE CÉLULAS T EN PERRO

#### RESUMEN

El Linfoma Intravascular (LI) es un desorden linfoproliferativo raro caracterizado por la proliferación intravascular de linfocitos neoplásicos con ninguna o mínima afectación del parénquima. El sistema nervioso central y la piel son los tejidos más comúnmente afectados. Los LI de células B han sido reportados más frecuentemente que los de origen T. Este trabajo describe los hallazgos anatomopatológicos e imuno-histoquímicos de un perro con LI de células T en múltiples órganos, incluyendo encéfalo, hígado, adrenales, riñones y estómago.

**Palabras clave:** neuropatología, enfermedades de perros, linfoma intravascular, SNC.

<sup>1</sup> Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu.

<sup>3</sup> Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. Contato principal para correspondência.

<sup>4</sup> Professor Dr. Patologia Veterinária da Universidade Federal de Juiz de Fora



## INTRODUÇÃO

O linfoma intravascular (LI), também conhecido como linfoma angiotrópico ou angioendoteliomatose maligna, é uma desordem linfoproliferativa rara caracterizada por proliferação intravascular de linfócitos neoplásicos com nenhum ou mínimo envolvimento do parênquima (1,2). O termo angioendoteliomatose foi usado inicialmente porque se acreditava que a origem das células neoplásicas era endotelial (3). Estudos têm mostrado que essas células na verdade são de origem linfoide (4). Esta neoplasia é bem descrita em humanos, porém possui relatos escassos em cães (5).

Os achados secundários mais comuns do LI são trombose, hemorragia e infarto (1,6). Os tecidos mais afetados com LI são o sistema nervoso central (SNC) e a pele (2). Os pulmões, fígado, olhos, rins, adrenais, linfonodos, medula óssea e baço são menos frequentemente acometidos (6-10). Não há sinais clínicos específicos do LI até vasos sanguíneos de múltiplos órgãos serem afetados. Em humanos, há raros casos onde somente o SNC foi afetado (11).

Apesar das células neoplásicas ficarem no lúmen dos vasos sanguíneos, o esfregaço sanguíneo não é capaz de detectar células neoplásicas, sendo necessário o exame histopatológico para diagnóstico do LI (5,12).

Histologicamente, o lúmen dos vasos linfáticos, seios e vasos sanguíneos estão ocluídos por linfócitos neoplásicos e estes estão limitados ao espaço intravascular (2). O subendotélio pode apresentar invasão neoplásica. Linfomas de células B são mais descritos que linfomas da linhagem T (10).

O presente relato descreve os achados anatomopatológicos de um raro caso de linfoma intravascular de linfócitos T em um cão, afetando múltiplos órgãos como rim, adrenal, encéfalo, fígado e estômago.

## RELATO DE CASO

Um cão macho, de 12 anos de idade, Cocker Spaniel, foi encaminhado para necropsia com histórico de hiporexia, emaciação, prostração e letargia por três meses. Além disso, o animal apresentava-se mais agressivo quando o proprietário fazia alimentação forçada. No exame radiográfico observaram-se áreas multifocais, irregulares e radiodensas no estômago. O animal foi submetido à laparotomia exploratória visto que se suspeitou de corpo estranho gastrointestinal. Nenhum corpo estranho foi encontrado e o animal teve parada cardiorrespiratória, morrendo durante a cirurgia. Os exames bioquímicos revelaram enzimas hepáticas altas (AST, ALT, bilirrubina), baixa albumina e hipercalemia.

Macroscopicamente, as leptomeninges do encéfalo estavam congestionadas com múltiplas sufusões (Fig. 1A). Todo o fígado apresentava evidência do padrão lobular. Os rins estavam pálidos e com múltiplas áreas de hemorragia na junção corticomedular. Amostras de vários órgãos (fígado, encéfalo, coração pulmão, adrenais, estômago, rim, baço, linfonodos e bexiga) foram coletadas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% para processamento histológico de rotina (feitos blocos de parafina e corados com coloração de hematoxilina e eosina).

A imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada utilizando o sistema de polímero e diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. A recuperação de antígenos foi feita por calor com tampão citrato Pascal (Dako) em panela de pressão. Para bloquear a atividade da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas numa solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) em álcool metílico. Os reagentes foram aplicados manualmente, com uma incubação de uma hora para os anticorpos monoclonais primários e anticorpo secundário. O cromógeno de DAB foi aplicado por cinco minutos. O painel de anticorpos de IHQ está descrito na Tabela 1. Os cortes de IHQ foram contrastados com hematoxilina de Harris. Os controles positivos

consistiram de IHQ para linfonodos normais de cão. Para controles negativos, os anticorpos primários foram substituídos por PBS.

Tabela 1. Painel imuno-histoquímico realizado em um caso canino de linfoma intravascular de células T.

Anticorpo primário	Marca	Diluição	Método de recuperação	Período de incubação	Anticorpo secundário
CD3	Dako	1:500	Citrato Pascal	ON	Envison
CD79a	Dako	1:50	Citrato Pascal	ON	Envison

Microscopicamente, o lúmen dos vasos sanguíneos das leptomeninges e dos lobos temporal e occipital estavam expandidos por numerosas células neoplásicas arredondadas com bordos distintos e citoplasma basofílico escasso (Fig. 1B). O núcleo era redondo com cromatina grosseiramente pontilhada e com um ou dois nucléolos evidentes (Fig. 1C). Notou-se anisocitose e anisocariose moderadas e seis figuras de mitose em dez campos de maior aumento (400x). Multifocalmente, os vasos sanguíneos estavam parcialmente ocluídos por trombos de fibrina que eram compostos por material brilhante eosinofílico, homogêneo com debris celulares. A mesma proliferação neoplásica foi observada nos vasos do fígado, rins (Fig. 1C), adrenais e estômago. Não foi encontrada uma massa que envolvia o parênquima em nenhum dos tecidos avaliados. Na imuno-histoquímica (IHQ), as células neoplásicas foram fortemente positivas para anticorpos anti-CD3 (Fig. 1D) e negativas para os anti-CD79. A positividade do anti-CD3 para linfócitos neoplásicos foi limitada aos espaços intravasculares.

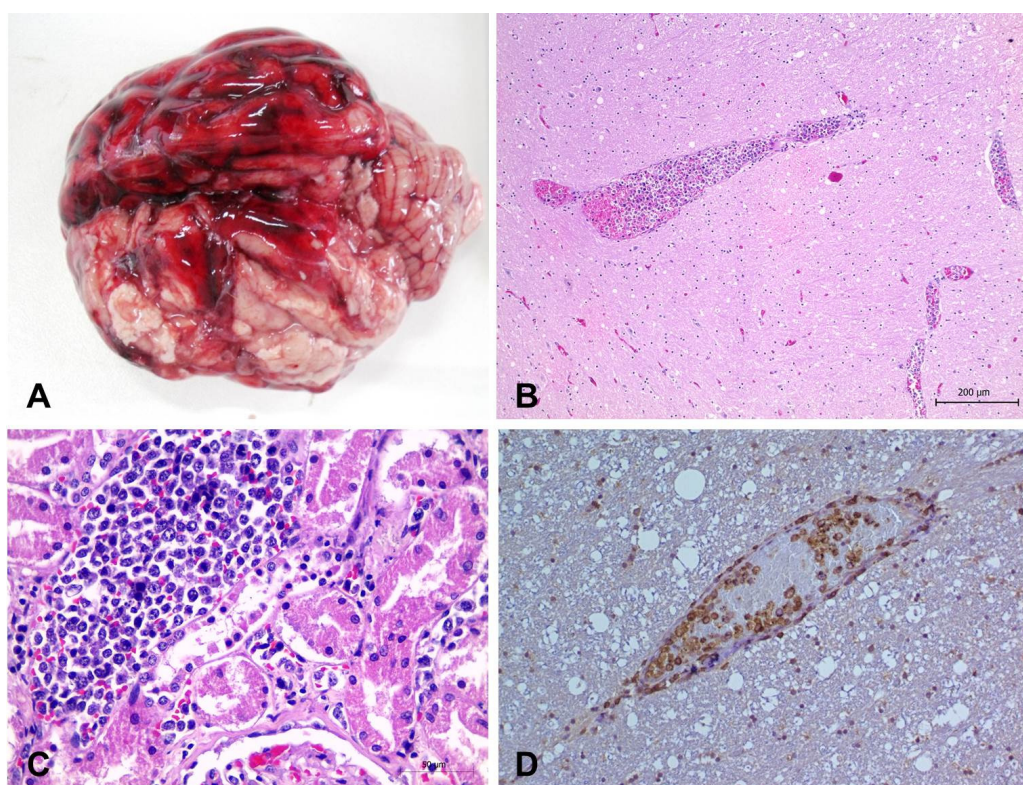


Figure 1. Intravascular T-cell lymphoma in a dog. **A.** Brain leptomeninges presents congestion and extensive areas of hemorrhages. **B.** Brain, thalamus. The blood vessels lumen are expanded by numerous neoplastic round cells (HE). **C.** Kidney. Detail of the cortical zone showing the neoplastic intravascular proliferation of round cells (HE). **D.** Brain, thalamus. Intravascular neoplastic cells are strongly positive to anti-CD3 antibody (IHC).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O principal achado microscópico observado no SNC no presente relato pode estar relacionado com os sinais neurológicos do animal. Em outros relatos de LI, ataxia de medula espinhal, paralisia posterior, andar em círculo, convulsões, doença vestibular, incoordenação e tetraplegia espástica já foram descritas (1,13,14). Há um relato de LI com manifestação incomum de efusão bicavitária com dispneia e distensão abdominal (5). A neoplasia é descrita com maior frequência em adultos ou idosos, tanto em humanos como em cães (2), como observado no presente relato.

Os achados macroscópicos do LI incluem hemorragia em alguns órgãos (1,14), como observado no presente relato. Os achados microscópicos do cão deste relato são típicos de LI. As mesmas alterações histológicas afetando múltiplos órgãos têm sido descritas, onde o SNC e a pele são os locais mais comumente afetados em humanos (6,9) e em cães (5,14). No presente relato, além do SNC, especialmente no tálamo, a neoplasia atingia o fígado, estômago, rins e adrenais. Estes órgãos já foram anteriormente descritos (7-10), porém não há relatos de acometimento do estômago. A pele não foi coletada para avaliação histopatológica porque a necropsia era estética. Não há estudos que determinam o local de origem dos linfócitos neoplásicos. Alguns autores sugerem que estas células neoplásicas se limitam ao espaço intravascular porque elas expressam moléculas para aderirem ao endotélio vascular, como o CD44 e hialuronano, mas não possuem as moléculas para diapedese, como ICAM-1 e  $\beta_1$ -integrina (15). Alterações circulatórias secundárias, como trombose e infarto, são achados comuns nos casos de LI (1), como detectado no presente relato.

LI de linfócitos B são mais descritos do que os de linfócitos T em cães. Baseado nos achados imuno-histoquímicos, o presente caso é de linfócitos T. Poucos casos de LI com esta linhagem celular tem sido descritas em cão (5,14). LI pode ser incluído como diagnóstico diferencial de encefalopatias em cães.

## REFERÊNCIAS

1. Steinberg H. Multisystem angiotropic lymphoma (malignant angioendotheliomatosis) involving the humerus in a dog. *J Vet Diagn Invest.* 1996;8:502-5.
2. Vieren M, Sciort R, Robberech W. Intravascular lymphomatosis of the brain: a diagnostic problem. *Clin Neurol Neurosurg.* 1999;101:33-6.
3. Fulling KH, Gersell DJ. Neoplastic angioendotheliomatosis: histologic, immunohistochemical, and ultrastructural findings in two cases. *Cancer;* 1983;51:1107-18.
4. Sheibani K, Battifora H, Winberg CD, Burke JS, Ben-Ezra J, Ellinger GM, et al. Further evidence that "malignant angioendotheliomatosis is an angiotropic large-cell lymphoma. *New Engl J Med.* 1986;34:943-8.
5. Ridge L, Swinney G. Angiotrophic intravascular lymphosarcoma presenting as bicavity effusion in a dog. *Aust Vet J.* 2004;82:616-8.
6. Bush WW, Throop JL, Mcmanus PM, Kapatkin AM, Vite CH, Van Winkle TJ. Intravascular lymphoma involving the central and peripheral nervous systems in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2003;39:90-6.

7. Drobacheff C, Blanc D, Zultak M, Humbert P, Carbillet JP, Dupond JL, et al. Malignant angioendotheliomatosis reclassification as an angiotropic lymphoma. *Int J Dermatol.* 1989;28:454-6.
8. Molina A, Lombard C, Donlon T, Bangs C, Dorfman RF. Immunohistochemical and cytogenetic studies indicate that malignant angioendotheliomatosis is a primary intravascular (Angiotropic) lymphoma. *Cancer.* 1990;66:474-9.
9. DiGiuseppe JA, Nelson WG, Seifter EJ, Boiknott JK, Mann RB. Intravascular lymphomatosis: a clinicopathologic study of 10 cases and assessment of response to chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1994;12:2573-9.
10. Chapin JE, Davis LE, Kornfeld M, Mandler RN. Neurological manifestations of intravascular lymphomatosis. *Acta Neurol Scand.* 1995;91:494-9.
11. Sips GJ, Amory CF, Delman BN, Kleinman GM, Lipsey LR, Tuhim S. Intravascular lymphomatosis of the brain in a patient with myelodysplastic syndrome. *Nat Rev Neurol.* 2009;5:288-92.
12. Cobcroft R. Images in haematology: Diagnosis of angiotropic large B-cell lymphoma from a peripheral blood film. *Br J Haematol.* 1999;104:429.
13. McDonough SP, Van Winkle TJ, Valentine BA, Van Gessel YA, Summers BA. Clinicopathological and immunophenotypical features of canine intravascular lymphoma (malignant angioendotheliomatosis). *J Comp Pathol.* 2002;126:277-8.
14. Machado GF, Castro MB, Melo GD, Ferreira WL, Aylon EG, Alessi AC. Intravascular lymphomatosis in the central nervous system of dogs: immunohistochemical investigation in two cases. *Braz J Vet Pathol.* 2011;4:47-51.
15. Nakamichi N, Fukuhara S, Aozasa K, Morii E. NK-cell intravascular lymphomatosis – a mini-review. *Eur J Haematol.* 2008;81:1-7.

**Recebido em: 12/09/2015**

**Aceito em: 14/10/2015**



## DETECÇÃO MOLECULAR DE *Leishmania* spp. EM MATERIAL DE HEMOCULTURA, E DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE EM CÃES PROCEDENTES DO BAIRRO DA CONQUISTA, SÃO MANUEL-SP, BRASIL

Helio Langoni<sup>1</sup>  
Virgina Bodelão Richini-Pereira<sup>2</sup>  
Carlos Scremin<sup>3</sup>  
Marcella Zampoli Troncarelli<sup>1</sup>  
Janaína Biotto Camargo<sup>1</sup>  
Juliana Giantomassi Machado<sup>1</sup>  
Leila Sabrina Ulmann<sup>1</sup>  
Felipe de Freitas Guimarães<sup>1</sup>  
Daniela Barbosa da Silva<sup>1</sup>  
Gabriela Pacheco Sánchez<sup>1</sup>  
Simone Baldini Lucheis<sup>4</sup>

### RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos para os hospedeiros mamíferos por flebotomíneos infectados. Esta zoonose inclui um amplo espectro de manifestações clínicas, desde lesões cutâneas no local da picada dos flebotomíneos até a leishmaniose visceral sistêmica, podendo se apresentar como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção da LV, pois assume grande importância na transmissão da doença, provavelmente devido ao seu maior parasitismo cutâneo e por apresentar-se infectado em quase todos os focos brasileiros de calazar humano. Foram analisadas 197 amostras de sangue de cães procedentes do bairro da Conquista, no município de São Manuel-SP. Exames sorológicos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA foram realizados, sendo todos os animais não reagentes, bem como negativos ao exame parasitológico de punção de linfonodos. À hemocultura, 48/197 (24,3%) amostras apresentaram crescimento de tripanossomatídeos, sendo que, destas, três amostras (1,5%) foram positivas à técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. Apenas um animal (0,5%) com sintomatologia compatível foi positivo à PCR para *Leishmania* spp. O estudo ressalta a importância de esforços contínuos e permanentes na vigilância epidemiológica contra esta zoonose, visando o diagnóstico precoce de casos autóctones, para prevenção na disseminação do agente para o homem, animais e flebotomíneos. É imprescindível que as autoridades de Saúde Pública avaliem casos autóctones de leishmanioses.

**Palavras-chave:** Leishmaniose, hemocultura, cães, vigilância epidemiológica.

<sup>1</sup> Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ-UNESP-Botucatu.

<sup>2</sup> Pesquisadora Científica, Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais Bauru II.

<sup>3</sup> Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de São Manuel-SP.

<sup>4</sup> Pesquisadora Científica Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA Centro-Oeste – Bauru-SP.

**MOLECULAR DETECTION OF *Leishmania* spp. IN BLOOD CULTURE MATERIAL, AND LEISHMANIASIS SEROLOGICAL DIAGNOSIS IN DOGS FROM BAIRRO DA CONQUISTA, SAO MANUEL, BRAZIL**

**ABSTRACT**

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by *Leishmania* genus protozoa, and transmitted to mammals by infected phlebotomines. This zoonosis determines a high spectrum of clinical manifestations, like skin lesions at the local of phlebotomine's bite, or more severe signs in case of visceral systemic leishmaniasis. According to the *Leishmania*'s specie infection, the disease can be clinically presented as American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) or Visceral Leishmaniasis (VL). Dog (*Canis familiaris*) is the main VL infection source in the urban area, and has high importance in the disease transmission, probably due to its high cutaneous parasitism, and also because dogs are frequently diagnosed infected in all Brazilian regions where human visceral leishmaniasis cases are related. 197 blood samples were collected from dogs in Bairro da Conquista, in São Manuel-SP Brazil. Serum samples were evaluated by Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) and ELISA for *Leishmania* spp. diagnosis, and all resulted negative. The cytology of dogs' lymph nodes was also negative for *Leishmania* spp. 48/197 (24.3%) blood samples were positive to culture, with tripanosomatides visualization. Three of these positive samples (1.5%) were also positive by PCR for *Leishmania* spp. One blood sample collected from a VL symptomatic dog (0.5%) that was positive to culture was also positive by PCR. The present study reinforces the importance of continuous engagement on the epidemiological vigilance of this zoonosis, viewing the early diagnosis of autochthon cases for the prevention of disease transmission for human, animals and phlebotomines. It is essential that public health authorities be in constant alert for autochthon leishmaniasis cases searching.

**Keywords:** Leishmaniasis, blood culture, dogs, epidemiological vigilance.

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Leishmania* spp. EN MATERIAL DE HEMOCULTIVO, Y DIAGNOSTICO SOROLOGICO PARA LEISHMANIASIS EN PERROS DEL BARRIO DE LA CONQUISTA, SÃO MANUEL-SP, BRASIL**

**RESUMEN**

Leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida causada por protozoos del género *Leishmania*, y transmitida a hospederos mamíferos por flebótomos infectados. Esta zoonosis incluye un amplio espectro de manifestaciones como lesiones cutáneas en el sitio de la picadura de los flebótomos hasta la leishmaniasis visceral sistémica, y pueden presentarse como leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) y leishmaniasis visceral (LV). En las zonas urbanas, los perros (*Canis familiaris*) son la principal fuente de infección de LV, además son de gran importancia en la transmisión de la enfermedad, probablemente debido al mayor parasitismo cutáneo y por estar infectados en casi todos los sitios brasileños de leishmaniasis visceral humana. Fueron evaluadas 197 muestras de sangre de perros del barrio de la Conquista, en el municipio de São Manuel-SP, Brasil. Las pruebas serológicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA fueron realizadas, y todos los animales fueron no reactivos, así como en los exámenes parasitológicos de punción de nódulos linfáticos. En el hemocultivo, 48/197 (24,3%) de las muestras presentaron crecimiento de tripanosomas, incluso tres muestras fueron positivas en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Leishmania* spp. Solamente un animal (0,5%) con sintomatología compatible se

mostró positivo en la PCR de *Leishmania* spp. El estudio enfatiza la importancia de los esfuerzos continuos y permanentes para la vigilancia epidemiológica contra esta zoonosis, con objetivo de la detección temprana de los casos autóctonos, para evitar la propagación del agente a los humanos, animales y flebotomos. Es imprescindible que las autoridades sanitarias evalúen los casos autóctonos de leishmaniasis.

**Palabras clave:** Leishmaniasis, Hemocultivo, perros, vigilancia epidemiológica.

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos para os hospedeiros mamíferos por flebotomíneos infectados. Este protozoário tem um ciclo de vida dimórfico, cujos parasitas residem como promastigotas extracelulares no vetor e como amastigotas intracelulares em macrófagos no hospedeiro mamífero (1). As leishmanioses incluem um amplo espectro de manifestações clínicas, desde lesões cutâneas no local da picada dos flebotomíneos até a leishmaniose visceral sistêmica (2).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a leishmaniose como sendo a segunda protozoose mais importante da atualidade, ficando atrás apenas da malária, estando ainda entre as seis mais relevantes enfermidades infecto-parasitárias do mundo (3).

As lesões cutâneas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* no Novo Mundo são denominadas de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). São de grande importância como problema de saúde pública no Brasil, tanto pela ampla distribuição geográfica do parasita como pelo grau de destruição tecidual observada nas lesões cutâneas e mucocutâneas no homem (4), além do envolvimento psicológico do doente, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria das vezes, pode ser considerada uma doença ocupacional (3,5).

Na Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) os cães e os equídeos parecem desempenhar algum papel na manutenção do ciclo de vida do parasita, atuando como reservatórios e amplificadores da epizootia em surtos envolvendo o ser humano (6,7).

Já a Leishmaniose Visceral (LV), dada à sua incidência e alta letalidade, principalmente em crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade. Na América Latina, a LV já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste. A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão no país, inicialmente predominando pelas características de ambientes rurais e periurbanos e, mais recentemente em centros urbanos (8).

Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção da LV, pois assume grande importância na transmissão da doença, provavelmente devido ao seu maior parasitismo cutâneo e por apresentar-se infectado em quase todos os focos brasileiros de calazar humano (9). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem. O cão é muito importante na epidemiologia da LV, por se tratar do principal reservatório do agente no âmbito doméstico, pelo fato de viver em contato estreito com humanos e atrair a presença do vetor.

Exames parasitológicos baseados na demonstração das formas amastigotas do parasito por microscopia, tanto dentro dos macrófagos como na forma livre, permitindo o diagnóstico definitivo da infecção, podem ser facilmente realizados, sendo os procedimentos corados por Giemsa, Panótico ou Leishman (10, 11, 12). O isolamento das formas promastigotas de

*Leishmania* spp. por meios de cultura a partir de diversos tecidos, bem como a partir do sangue no caso das hemoculturas, apesar de trabalhoso, também é uma técnica possível (13).

Dentre os métodos moleculares, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido utilizada como ferramenta em pesquisas epidemiológicas, bem como para identificação de espécies de *Leishmania* spp., por amplificação seletiva de sequências de DNA do parasito. A detecção de DNA é possível em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de linfonodos, sangue, cortes histológicos de tecidos parafinados, e também no vetor (14, 12, 15).

Para uma melhor acuidade diagnóstica da LV faz-se necessário o uso de uma combinação de técnicas, uma vez que não está disponível um método que isoladamente reúna todas as características consideráveis desejáveis para o diagnóstico, tais como: fácil execução, custo acessível, rapidez e especialmente sensibilidade e especificidade altas. Recomenda-se que o diagnóstico desta doença seja realizado baseando-se na sintomatologia clínica, nas características epidemiológicas da região e nos exames laboratoriais, desta forma contribuindo para o destino correto dos animais verdadeiramente positivos. Isto é importante tanto para os aspectos de saúde pública quanto aos de ética, pois contribuirá para diminuição da eutanásia desnecessária de cães erroneamente considerados infectados.

A hemocultura representa um teste parasitológico cuja positividade demonstra a presença do parasita na corrente sanguínea, o qual é visualizado ao microscópio óptico. Esta é uma diferença importante em relação à técnica de PCR, a qual tem capacidade de detectar DNA do parasita, que não necessita estar presente inteiro na circulação (16).

Quando se identifica hemocultura positiva, é desejável obter lâmina corada, o que se torna difícil, devido à necessidade da presença de parasitas em quantidade suficiente para sua visualização. Estudos confirmam que a hemocultura é sensível para o diagnóstico da doença de Chagas, sendo que pode haver resultados persistentemente negativos, mesmo que a sorologia convencional mostre sempre resultado positivo (13). Sua sensibilidade aumenta quando o volume e o número de amostras é maior, o tempo entre a coleta e o processamento é menor e quando se utiliza o meio LIT (Liver Infusion Tryptose) para cultivo (17).

Os métodos diagnósticos sorológicos da LVC antes recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) eram o ELISA como método de triagem e a RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) como confirmatório (18). Apesar das conhecidas vantagens apresentadas por esta técnica, como facilidade na execução, rapidez na emissão de resultados e baixo custo (19,20), este teste apresenta algumas desvantagens, pois poderia identificar grande número de animais falso-positivos e, sendo assim, não seria o mais específico para o diagnóstico da LV, tendo em vista a possibilidade de apresentar reação cruzada com outras enfermidades, como a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), com a doença de Chagas, ou ainda, com outros agentes infecciosos, tais como *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Babesia canis* e *Dirofilaria immitis* (21,22,23,24). Porém, atualmente, com o intuito de aperfeiçoar a técnica de diagnóstico da LVC, o Ministério da Saúde estabeleceu a substituição do protocolo de triagem com ELISA e confirmação com RIFI, com a implantação do teste rápido imunocromatográfico com antígenos recombinantes (k26 e k39) como triagem e o ELISA como confirmatório, considerando vantagens e facilidades no teste rápido imunocromatográfico e ao fornecimento de resultados semi-automatizados sem subjetividade no ELISA (25).

Tendo em vista as dificuldades de controle da doença, a metodologia proposta para a vigilância e adoção de medidas baseia-se em uma melhor definição das áreas de transmissão ou de risco. O novo enfoque é o de incorporar os estados e municípios silenciosos, ou seja, sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença, nas ações de vigilância da mesma, visando assim evitar ou minimizar os problemas referentes a este agravo em áreas sem transmissão.

O município de São Manuel (SP), de acordo com a Secretaria de Estado de Saúde e Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), foi classificado como silencioso não receptivo e vulnerável, ou seja, não apresenta confirmação de casos autóctones humanos ou caninos e não há presença conhecida do vetor (26,27). Está localizado próximo a Botucatu-SP, onde a cidade também é considerada silenciosa a respeito da leishmaniose, pois ainda não se encontrou o vetor flebotomíneo no local. Por este motivo, a detecção precoce de casos caninos por meio de exames sorológicos e a possível identificação da espécie dos parasitas obtidos de aspirados de linfonodos e/ou medula óssea dos animais procedentes do Bairro da Conquista poderão auxiliar na adoção de condutas estratégicas rápidas visando à prevenção e controle das leishmanioses pelos órgãos de saúde, especialmente em se tratando de LV, na tentativa de bloquear a expansão da doença e a ocorrência de casos humanos e caninos.

Desta forma, o objetivo do trabalho foi detectar mediante exames laboratoriais os cães positivos para *Leishmania* spp., procedentes do Bairro da Conquista, em São Manuel-SP, tendo em vista que os mesmos apresentavam sintomas sugestivos para leishmaniose (emaciação, alopecia, pêlos quebradiços e opacos, úlceras de pele, etc).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram analisados 197 soros de cães sintomáticos e assintomáticos do bairro da Conquista, no município de São Manuel-SP, dos quais 64 (32,5%) eram provenientes de cães machos e 133 (67,5%) de fêmeas, sendo que 22/197 (11,1%) dos animais que apresentavam sinais clínicos sugestivos de leishmaniose eram machos, e 21/197 (10,6%) fêmeas (Tabela 1).

Tabela 1. Dados dos cães procedentes do Bairro da Conquista em São Manuel-SP, quanto as variáveis sexo e presença ou ausência de sinais clínicos.

Variável	Total (n) – (%)	Sinais clínicos*	
		*Sintomáticos - (%)	Assintomáticos-(%)
Sexo			
Machos	104 – 52,8	22 – 11,1	82 – 41,6
Fêmeas	93 – 47,2	21 – 10,6	72 – 36,6
<b>Total</b>	<b>197 – 100,0</b>	<b>43 – 21,8</b>	<b>154 – 78,2</b>

\*Foram considerados como sinais clínicos: onicogribose, emagrecimento progressivo, úlceras ou lesões na pele, pneumonia, linfadenomegalia, alopecia, esplenomegalia, hepatomegalia, lesões oculares e outros.

O exame clínico atentou para a condição corporal, coloração das mucosas, presença de lesões de pele (especialmente úlceras, feridas, lesões cicatrizadas com alopecia) e quaisquer outras alterações. Foi realizada palpação de cadeia linfática para constatação de infartamento de linfonodos, bem como palpação de fígado e baço para identificação de hepato e esplenomegalia.

As amostras de sangue foram coletadas para as provas sorológicas e hemocultura e para os cães sintomáticos, animais com linfonodos infartados ou amostras positivas nas provas anteriores, foi realizada a punção aspirativa de linfonodos e/ou punção de medula óssea para esfregaço em lâmina de vidro para identificação por exame parasitológico e PCR.

A pesquisa foi realizada com o consentimento e com a parceria da Prefeitura Municipal de São Manuel-SP.

### Hemocultura

Na hemocultura, foram separados três tubos, contendo, em cada um, 5mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) estéril. Com uma seringa estéril de 1mL, retirou-se a porção

Langoni H, Richini-Pereira VB, Scremin C, Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Ulmann LS. et al. Detecção molecular de *Leishmania* spp. em material de hemocultura, e diagnóstico sorológico para leishmaniose em cães procedentes do bairro da Conquista, São Manuel-São Paulo, Brasil. Vet. e Zootec. 2015 dez.; 22(4): 580-590.

plasmática e transferiu-se lentamente para o primeiro tubo. Este procedimento foi repetido para a porção leucocitária, a qual foi transferida para o segundo tubo e, igualmente para o sedimento de hemácias, o qual foi transferido para o terceiro tubo. As culturas foram mantidas em estufa a 28 a 30°C e analisadas quinzenalmente até quatro meses após a inoculação segundo Luz et al. (13), quando então as culturas positivas foram submetidas ao preparo para a extração do DNA de *Leishmania* spp. (28).

### Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* spp.

A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo et al. (29) Após a leitura dos controles, foi procedido o exame das amostras em teste, considerando-se como título final a maior diluição do soro em que ainda ocorresse fluorescência completa na borda de pelo menos 50% das promastigotas.

### Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA das amostras de linfonodo dos animais foi realizada empregando-se o Kit Illustra Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare). A quantificação foi avaliada em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare).

### Amplificação do DNA

A amplificação do DNA foi realizada utilizando os conjuntos de *primers* LIN R4 e LIN 19 segundo Ikonopoulou et al. (30) e perfil de ciclagem conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1: Iniciadores utilizados nas reações de Reação em Cadeia da Polimerase para *Leishmania* spp., indicando o tamanho do amplicon, a sequência e o perfil de ciclagem.

Agente	Amplicon	Iniciadores	Sequência	Perfil de ciclagem
<i>Leishmania</i> spp	720pb	LINR4	5'-GGGGTTGGTGTAAAATAGGG-3'	3min { 95°C- 32X { 95°C-30s 58°C-30s 72°C- 1min 72°C- 7min
		LIN19	5'-CAGAACGCCCTACCCG-3'	

As reações de PCR foram realizadas em microtubo de 0,5mL com volumes totais de 25 µL contendo tampão de reação 10mM Tris HCl pH 8.0, 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTP, 20µM de cada *primer*, 0,2 unidades de *Taq platinum* polymerase (Invitrogen) e 10ng de DNA genômico. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf).

A corrida eletroforética foi realizada utilizando gel de agarose a 1,5% adicionado de 0,5µg/mL de brometo de etídio em cuba horizontal contendo TBE 1X (89 nM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) e a voltagem empregada foi 65V. Após o término da corrida o gel foi visualizado em transluminador de luz UV e a imagem foi capturada pelo sistema GelDoc-It<sup>®</sup> Imaging System.

Foi utilizado 4 µL de marcador de 100pb (Invitrogen) e 8 µL da amostra. Em cada amostra avaliada, bem como para o marcador molecular, foi adicionado 2 µL do tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água Milli-Q).

## RESULTADOS

Observaram-se formas flagelares em 48/197 (24,3%) hemoculturas, enquanto que em 149/197 (75,7%) não houve crescimento (Tabela 2).

Tabela 2. Exames de hemocultura em meio \*LIT/NNN a partir de amostras de sangue de 197 cães procedentes do bairro da Conquista, São Manuel – SP.

Número de amostras	Hemoculturas		
	Negativos	Positivos	
197	149	48	
<b>Total (%)</b>	<b>75,7</b>	<b>24,3</b>	<b>100,0</b>

\*LIT= meio Liver Infusion Tryptose + meio NNN (Mc Neal, Novy & Nicolle) para cultivo de *Leishmania*

Os demais resultados das avaliações sorológicas (ELISA e RIFI), parasitológico direto e molecular de aspirado de linfonodo foram negativos para 100% das amostras. De todas as hemoculturas positivas, 3/48 (6,25%) foram positivas à prova de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp., sendo que destes, apenas um cão (0,5%) apresentava sintomatologia característica de leishmaniose, porém não apresentou sorologia positiva.

Das 48 (24,3%) amostras positivas na hemocultura, 28/197 (14,2%) eram de animais machos e 20/197 (10,1%) eram fêmeas, no entanto nos resultados de PCR, apenas 3 amostras (1,5%) foram positivas para *Leishmania* spp. e as 3 amostras se tratavam de animais fêmeas, onde apenas 1 animal (0,5%) apresentava sintomatologia sugestiva da doença (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. PCR para *Leishmania* spp. a partir das amostras de 48 hemoculturas positivas de cães procedentes do Bairro da Conquista, São Manuel –SP.

Número de Amostras	* PCR hemoculturas positivas		
	Negativos	Positivos	
48	45	3	
<b>Total (%)</b>	<b>93,75</b>	<b>6,25</b>	<b>100,0</b>

\*Apenas foram realizados PCR das amostras que se mostraram positivas à hemocultura.

Tabela 4. Associação da variável sexo com a sintomatologia, hemocultura e PCR para *Leishmania* spp.

Variável	Animais – (%)	Sintomatologia clínica	Hemoculturas Positivas	*PCR Positivos
<b>Sexo</b>		<b>*Sintomáticos</b>		
<b>Machos</b>	<b>104 – 52,8%</b>	<b>22 – 11,1%</b>	<b>28 – 14,2%</b>	<b>0 – 0,0%</b>
<b>Fêmeas</b>	<b>93 – 47,2%</b>	<b>21 – 10,6%</b>	<b>20 – 10,1%</b>	<b>3 – 1,5%</b>
<b>Total</b>	<b>197 – 100,0%</b>	<b>43 – 21,8%</b>	<b>48 – 24,3%</b>	<b>3 – 1,5%</b>

\*PCR – apenas foi realizado PCR de amostras com hemoculturas positivas.

## DISCUSSÃO

Langoni et al. (31), em pesquisa de vigilância epidemiológica no município de Botucatu-SP, avaliaram 781 amostras de soro canino durante campanha de vacinação anti-rábica, para pesquisa de anticorpos da classe IgG anti *Leishmania* spp. pela técnica de RIFI. Todos os soros testados foram negativos, o que indica que a cidade, naquele momento, não apresentava risco potencial para ocorrência de surto epidêmico de leishmaniose.

O exame sorológico pelas técnicas de RIFI e ELISA já é consolidado em inquéritos caninos para a detecção da leishmaniose visceral, apresentando altas taxas de sensibilidade e

especificidade (32; 33). Entretanto, os resultados dessas metodologias relacionados à forma cutânea da doença são discordantes. Pode ser ressaltada a importância de uma terceira técnica, a hemocultura. Dado que no estudo os animais positivos à hemocultura foram negativos à PCR para *Leishmania* spp., o valor desta técnica seria avaliar a positividade a tripanossomatídeos em geral, sendo necessário outras provas moleculares para confirmação diagnóstica.

Em infecções humanas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* é descrito que a resposta imune é predominantemente celular, determinando assim fraca resposta humoral e baixa quantidade de anticorpos séricos detectáveis pelos métodos tradicionais (34).

Tomaz-Soccol et al. (35), em estudo realizado no Estado do Paraná, avaliaram casos autóctones de leishmaniose visceral em 24 cães que apresentavam perfil clínico compatível com leishmaniose. Para tanto, foram realizadas hemoculturas e culturas de punção de medula óssea e linfonodos em meio NNN, tendo-se culturas positivas em 19 das 24 culturas realizadas. Quatorze isolados foram identificados pela técnica de RAPD-PCR como *L. (Leishmania) infantum* e cinco como *L. (Viannia) braziliensis*, concluindo-se que todos os cães com *L. (L.) infantum* tratavam-se de casos autóctones.

Tendo em vista que o município de São Manuel localiza-se a cerca de 23 Km de Botucatu, bem como próximo a Lençóis Paulista –SP (aproximadamente 30 Km) justifica-se a necessidade da vigilância epidemiológica para esta zoonose, já que, conforme o Programa Estadual de Controle da Leishmaniose Visceral Americana (LVA), o município de Botucatu está classificado como “silencioso, não receptivo e vulnerável”, com ausência de casos autóctones humanos e caninos, sem confirmação comprovada do vetor, porém próximo e com fluxo frequente de animais e pessoas para municípios com epidemias recentes, como Bauru, Agudos e Lençóis Paulista, que apresentam transmissão humana e canina confirmada e são municípios, assim como Botucatu, localizados às margens da Rodovia Marechal Rondon, uma das vias mais movimentadas do interior paulista e possível rota de disseminação da infecção pelo Estado (36).

No período entre 1999 e 2013, o município de Botucatu registrou 16 casos de LTA e nenhum caso de LVA, e Lençóis Paulista registrou 5 casos de LTA e 3 casos de LVA, sendo um caso no ano de 2007 outro no ano de 2010 e o terceiro caso em 2013 (37,38).

Portanto, o estudo ressalta a importância de esforços contínuos e permanentes na vigilância epidemiológica contra esta doença, visando o diagnóstico precoce de casos autóctones, para prevenção posterior na disseminação do agente para o homem, animais e flebotomíneos. É imprescindível que as autoridades de Saúde Pública avaliem casos autóctones de leishmanioses, para que sejam implementadas as medidas de vigilância e controle destas zoonoses, bem como o apoio de médicos veterinários das clínicas da região e campanhas de conscientização da população a respeito da enfermidade.

## AGRADECIMENTOS

À Prefeitura Municipal de São Manuel pelo suporte financeiro e aos médicos veterinários André A. Cutolo, Audrey Rennó Campos Braga, Luciano José Eloy, Priscila Barbante e Patrícia Yoshida Faccioli Martins, pela ajuda na colheita das amostras e registro dos dados.

## REFERÊNCIAS

1. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saraiva NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005; 366:1561-1577.



2. Call MC, Zang WW, Matlashewski G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLOS Pathogens*. 2003; 9.
3. Brasil. Guia de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde. Fundação Nacional De Saúde, Centro Nacional De Epidemiologia, Coordenação Nacional De Dermatologia Sanitária. Brasília. 1994; 44p.
4. Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1994; 89:427-434.
5. Dourado MIC, Noronha CV, Alcantara N, Ichihara MYT, Loureiro S. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do Estado da Bahia (Brasil). *Rev. Saude Pub*. 1989; 23:2-8.
6. Yoshida ELA, Correa FMA, Marques SA, Stolf HO, Dillon NL, Momen H, Grimaldi Júnior G. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (= *L. braziliensis braziliensis*) in the south-west Region of São Paulo State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1990; 85:133-134.
7. Lonardon MVC, Teodoro U, Arraes SMAA, Silveira TGV, Bertolini DA, Ishikawa EAY, Shaw JJ. Nota sobre leishmaniose canina no noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Rev. Saude Pub*. 1993; 27:378-379.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília. 2006.
9. Machado JG. Comparação do diagnóstico sorológico da Leishmaniose visceral Canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003-2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2004; 48p.
10. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002; 9:951-958.
11. Simões-Mattos L, Mattos MRF, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilaqua CML, Prata-Júnior RC, Holanda CM, Rondon FCM, Bastos KMS, Coêlho ZCB, Coêlho ICB, Barral A, Pompeu MML. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Veterinary Parasitology*. 2005; 127:199-208.
12. Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 3 ed. Canadá: Saunders/Elsevier. 2006; 1387p.
13. Luz ZMP, Coutinho MG, Caçado JR, Krettli AU. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1994; 27: 146-148.
14. Muller N, Zimmermann V, Forster U, Bienz M, Gottstein B, Welle M. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol*. 2003; 114(3):223-229.
15. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Ministério da Saúde. 2011.

16. Lucheis SB, Da Silva AV, Araújo Jr. JP, Langoni H, Meira DA, Marcondes-Machado J. et al. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas' disease living in Botucatu town and surrounding region. São Paulo State, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005; 11(4): 492-509.
17. Portela-Lindoso AAB & Shikanay-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saúde Pública*. 2003; 37(1): 107-115.
18. São Paulo. Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) e Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo. 2006.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília. 2003; 9-18.
20. Mohammed AR, Wrigth EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ, Pondman KW. Serodiagnosis Sudanese visceral an mucosal leishmaniasis: comparasion of Elisa-immunoflorescence and indirect haemagglutination. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1985; 80:271-274.
21. Brasil. Ministério Da Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). 2 ed. Brasília: Fundação Nacional da Saúde. 1996.
22. Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluoresce assay. *Vet. parasitol*. 1996; 65(1):1-9.
23. Alvar J, Canãvete C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. 2004; 57: 1-58.
24. Gomes APS, Cordeiro RLR. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. *Rev. Bras. Parasitol. Vet*. 2004; 23(1):238.
25. Luciano RM, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. 2009; 46:181-187.
26. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Ministério da Saúde. 2011.
27. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília. 2003; 9-18.
28. Rangel O, Himaroto MR, Henriques LF, Taniguchi HH, Ciaravolo RMC, Tolezano JE, França ACC, Yamashiro J, Oliveira SS. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo para 2013. *BEPA*. 2013; 10(111):5-16.

29. Pinto PLS. Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. 141f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. 2000.
30. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the sorodiagnosis of american trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1966; 8:227-234.
31. Ikonopoulou J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Veterinary Parasitology. 2003; 113:99-103.
32. Langoni H, Modolo JR, Souza LC, Araujo WN, Shimabukuro FH, Mendonca AO, Leite BLS, Padovani CR. Epidemiological vigilance for canine leishmaniasis in the country of Botucatu, SP, Brazil. ARS Veterinária. 2001; 17:196-200.
33. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos: 1ª ed. Brasília. 2006.
34. Oliveira LS, Julião FS, Souza VMM, Freitas DS, Souza BMPS, Paule BJA, Aguiar PHP, Melo SMB, Franke CR. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. Ciência Animal Brasileira 2005; 6:41-47.
35. Ajadary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A, Coutinho SD. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. Journal of Infectious Diseases. 1996; 173:758-761.
36. Tomaz-soccol V, Castro EA, Navarro IT, De Farias MR, Carvalho Y, Bispo S, Membrve NA, Minozzo JC, Truppel J, Bueno W, Luz E. Allochthonous cases of canine visceral leishmaniasis in Paraná, Brazil: epidemiological implication. Revista Bras. Parasitol. Vet. 2009; 18(3):46-51.
37. São Paulo. Secretaria do Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Distribuição do número de Casos autóctones e óbitos de LVA, no Estado de São Paulo, Disponível on line em [http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/lvah\\_lpi.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/lvah_lpi.htm) Acesso em Nov/2014.
38. São Paulo. Secretaria do Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Leishmaniose Tegumentar Americana. Distribuição do número de Casos Confirmados segundo GVE de Notificação e Ano de Diagnóstico e segundo GVE de Residência e Ano Diagnóstico. Estado de São Paulo, 2007-2013. Disponível on line em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/lta\\_lpi.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/lta_lpi.htm) Acesso em Nov/ 2014.

**Recebido em: 11/06/2014**

**Aceito em: 22/04/2015**

## SOROEPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* EM GATOS ATENDIDOS EM HOSPITAL VETERINÁRIO DE BOTUCATU, SP, BRASIL

José Francisco Antunes Ribeiro<sup>1</sup>  
Alessandra Melchert<sup>2</sup>  
Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães-Okamoto<sup>2</sup>  
Joyce Cappa Mittestainer<sup>3</sup>  
Sâmea Fernandes Joaquim<sup>4</sup>  
Raissa Saran Sartori<sup>4</sup>  
Daniele Silvano Gonçalves<sup>5</sup>  
Hélio Langoni<sup>6</sup>

### RESUMO

Zoonoses são doenças comuns entre humanos e os animais. A toxoplasmose é uma importante zoonose, sendo os gatos e outros felídeos hospedeiros definitivos do protozoário *Toxoplasma gondii*, agente da enfermidade. Esse estudo buscou avaliar a frequência da infecção por esse agente em felinos, na região de Botucatu, pela avaliação sorológica de 100 gatos atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ - Unesp– Botucatu, e avaliar os resultados frente a algumas variáveis epidemiológicas. Encontrou-se soropositividade para anticorpos da classe IgG anti-*Toxoplasma gondii* na reação de imunofluorescência indireta - RIFI em 10% dos animais, com títulos de 16 a 256, com maior frequência em fêmeas, e animais adulto-idosos.

**Palavras-chave:** toxoplasmose, felino, zoonoses.

### SEROEPIDEMIOLOGY OF TOXOPLASMA GONDII INFECTION IN CATS ATTENDED AT VETERINARY HOSPITAL OF BOTUCATU, SP, BRAZIL

### ABSTRACT

Zoonoses are common diseases among humans and animals. Toxoplasmosis is an important zoonosis, and cats and other felines are definitive hosts of the protozoan *Toxoplasma gondii*, agent of this illness. This study evaluated the frequency of this infection, by serologic evaluation of 100 cats examined at the Veterinary Hospital of FMVZ - UNESP - Botucatu, and to compare the results with some epidemiological variables. It was found seropositivity for IgG class antibodies to *Toxoplasma gondii* by the indirect immunofluorescence in 10% of animals with titles from 16 to 256, with higher frequency in females and older-adult animals.

**Keywords:** toxoplasmosis, feline, zoonoses.

<sup>1</sup> Médico Veterinário Residente em Clínica Médica de Pequenos Animais - FMVZ/UNESP - Botucatu

<sup>2</sup> Profa. Dra. Clínica Médica de Pequenos Animais - FMVZ/UNESP - Botucatu

<sup>3</sup> Médico Veterinário - Curso de Treinamento Prático em Moléstias Infecciosas - FMVZ/UNESP - Botucatu

<sup>4</sup> Residente em Medicina Veterinária, Área de Zoonoses e Saúde Pública - Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ/UNESP - Botucatu

<sup>5</sup> Mestranda em Patologia Clínica Veterinária, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ – UNESP - Botucatu, SP.

<sup>6</sup> Prof. Titular de Zoonoses - Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ/UNESP - Botucatu. Bolsista PQ-CNPq-1A. Contato principal para correspondência.

## SEROEPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCIÓN POR *TOXOPLASMA GONDII* EN GATOS CONSULTADOS EN EL HOSPITAL VETERINÁRIO DE BOTUCATU, SP, BRASIL

### RESUMEN

Las zoonosis son enfermedades comunes entre los seres humanos y los animales. La toxoplasmosis es una zoonosis importante, gatos y otros felinos son huéspedes definitivos del parásito *Toxoplasma gondii*, agente de esta enfermedad. Este estudio evaluó la frecuencia de la infección por este agente, por la evaluación serológica de 100 gatos examinados en el Hospital Veterinario de la FMVZ - UNESP - Botucatu, y comparar los resultados con algunas variables epidemiológicas. La seropositividad para anticuerpos de la clase IgG para *Toxoplasma gondii* en la inmunofluorescencia indirecta fue de 10%, con títulos de 16 a 256, con una mayor frecuencia en las hembras y animales mayores y adultos.

**Palabras clave:** toxoplasmosis, felino, zoonosis.

### INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma importante zoonose de distribuição mundial, conhecida por causar várias alterações sistêmicas, desde reprodutivas até neurológicas, principalmente em pacientes imunossuprimidos. A infecção pode ter graves consequências em gestantes, podendo-se considerar como sério problema de saúde pública. É causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório, podendo parasitar a maioria dos mamíferos, desde animais silvestres e domésticos, aves e inclusive, humanos, sendo todos estes considerados hospedeiros intermediários.

Um importante aspecto epidemiológico da doença é a aproximação do ser humano com o gato doméstico (*Felis catus*), hospedeiro definitivo, ou seja, em que o parasita consegue realizar reprodução sexuada, eliminando de forma intermitente oocistos nas fezes, sem necessariamente estarem apresentando sinais clínicos (1). Estes oocistos esporulam no meio ambiente em condições de temperatura e umidade favoráveis, tornando-se infectantes para diferentes espécies animais, incluindo-se as aves (2). A ocorrência da toxoplasmose em gatos domésticos está muito relacionada com a ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos, devido ao hábito de carnivorismo desta espécie ou ainda a partir da água ou do próprio solo contaminados com oocistos esporulados, eliminados por outros felídeos (3).

Pelo fato da toxoplasmose felina poder ocorrer pela ingestão de roedores ou de passeriformes infectados com cistos teciduais, pode-se esperar prevalência relativamente alta nos felinos, colaborando ainda mais para a disseminação de oocistos, que podem sobreviver, após esporulação no ambiente, por até um ano (4). É visível, atualmente, o crescimento no atendimento à felinos em clínicas e hospitais veterinários, e mesmo que nesses animais a doença clínica ocorra com menor frequência, é importante o diagnóstico da infecção, na medida em que possibilita avaliar a dispersão do agente no ambiente, e os riscos de exposição (5).

Os métodos diagnósticos mais utilizados são baseados em exames sorológicos, relativamente de fácil realização. Vários testes sorológicos com diferentes sensibilidades e especificidades podem ser realizados, sendo os mais utilizados: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Método de Aglutinação Direta (MAD) (6). A RIFI é baseada na detecção de anticorpos da classe IgG ou IgM anti-*T.gondii* de acordo com a espécie (7). Imunoglobulinas da classe IgM representam respostas agudas e da classe IgG, resposta crônica, podendo muitas vezes indicar contato prévio com o agente (8).

A literatura mostra resultados variáveis referentes à pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em felinos. Garcia et al. (7) estudando a frequência da toxoplasmose em gatos da zona rural de Jaguapitã, PR, encontraram diferenças com relação à idade com aumento da soropositividade nos animais mais idosos. Em estudo realizado por Da Silva et al. (6) em 100 amostras de soro de felinos encontrou-se pelos testes de aglutinação direta (MAD) e RIFI, 19,09% e 18,09% de positividade, respectivamente. Trabalhando com soro de 41 gatos não domiciliados de área urbana de Niterói-RJ, Netto et al. (9) encontraram 24,39% de soropositividade sendo 10 para IgG na hemaglutinação indireta e um para IgM anti-*T. gondii* no teste de ELISA.

Pela utilização da hemaglutinação indireta, Araújo et al. (4) encontraram em 100 amostras de soro felinos 37,0% de animais reagentes, já Langoni et al. (3) pesquisaram pela RIFI anticorpos IgG anti-*T. gondii*, encontrando 19,4%.

A soroe epidemiologia da toxoplasmose em gatos, avaliada por Pinto et al. (10), revelou que entre 245 animais 26,9% foram positivos na hemaglutinação indireta e 37,9% na reação de imunofluorescência indireta. Já Cruz et al. (11) ao pesquisarem a frequência da infecção por *T. gondii* em gatos de Curitiba-PR, encontraram 16,3% de positividade e Galvani et al. (12) obtiveram 26% de reagentes, com diferença significativa com relação a faixa etária.

Considerando-se a importância dos gatos na cadeia epidemiológica de transmissão da toxoplasmose pela eliminação de oocistos pelas fezes, que ao esporularem no ambiente se tornam infectantes para os animais, incluindo aves e humanos, e a importância dos estudos de frequência da infecção em felinos, bem como a variabilidade de resultados obtidos em diferentes estudos, e a importância de se conhecer a dispersão do *T. gondii* no ambiente, o presente estudo avaliou aspectos epidemiológicos na infecção toxoplásmica em gatos atendidos no Hospital Veterinário-FMVZ-Unesp, além da pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii*, avaliando-se os resultados com variáveis como sexo, idade, raça e habitat.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 100 amostras de soro dos gatos atendidos no período de 01/04/2014 a 01/09/2014 no Hospital Veterinário (HV) da FMVZ - Unesp Campus de Botucatu de acordo com a rotina de atendimento do mesmo, para pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii*. Foram obtidos dados epidemiológicos relevantes para toxoplasmose, como sexo, idade, raça e ambiente onde residem, utilizando-se a ficha de atendimento de rotina do HV que constam os dados semiológicos e clínicos do animal, na tentativa de verificar possível influência das variáveis avaliadas.

O sangue foi coletado por venopunção jugular e, após centrifugação, armazenado em microtubos de polipropileno estéreis a -20°C até seu processamento no Núcleo de Pesquisa em Zoonoses (NUPEZO) FMVZ /UNESP – Botucatu/SP. As amostras foram avaliadas pelo método de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo a técnica de Camargo (13), utilizando-se como ponto de corte a diluição 1:16. As amostras reagentes foram tituladas até obtenção de seu título final. Para comparar os resultados sorológicos obtidos, com as variáveis analisadas, utilizou-se o teste de Fisher, com nível de significância de 5% (14).

De acordo com a procedência dos animais obteve-se: Botucatu (73%), além de gatos de São Manuel (4%), Lençóis Paulista (3%), Bauru (3%), Bofete (2%), Avaré (1%), Americana (1%), Cerquilha (1%), Conchas (1%), Guarulhos (1%), Igarapé do Tiete (1%), Itatinga (1%), Jurumirim (1%), Macatuba (1%), Porangaba (1%), Promissão (1%), Quadra (1%), Sorocaba (1%), São Paulo (1%) e Tatuí (1%), sendo 58% machos e com relação a idade 49% maiores que 5 anos, 29% menores de 2 anos, e 22% com idades entre 2 e 5 anos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados revelou 10% de soropositividade, sendo 6% com título 16, 3% com título 64 e 1% com título 256. De acordo com o sexo, obteve-se 6% de positividade para fêmeas e 4% para machos. Com relação à idade, 3% de positividade para os animais com idade até 2 anos, 1% entre 2 e 5 anos e 6% nos animais com idade superior a 5 anos. Analisando-se a procedência dos animais obteve-se 9% de positividade para os animais procedentes de Botucatu de um total de 73 animais provenientes desta cidade, e apenas um outro animal positivo da cidade de Avaré, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos animais sororreagentes para *Toxoplasma gondii* em relação ao sexo, idade e cidade de procedência. Botucatu, 2014

Variável		Soropositividade (n)	p
Sexo	Macho	4	0,31
	Fêmea	6	
Total		10	
Idade	Até 2 anos	3	0,62
	> 2 até 5 anos	1	
	> 5 anos	6	
Total		10	
Cidades	Botucatu	9	0,86
	Avaré	1	
	Outras	0	
Total		10	

Intervalo de confiança da soropositividade (95%): 5% - 17%.

Os resultados do presente estudo com 10% de soropositividade, discordam dos encontrados por outros pesquisadores. Garcia et al. (7) analisando 163 animais encontraram 73% de soropositividade, inclusive com títulos mais elevados, ressaltando-se, entretanto, que eram gatos da zona rural que provavelmente tinham maior chance de exposição às formas infectantes do parasita, incluindo-se os oocistos eliminados por felídeos, bem como pelo hábito de carnivorismo, possibilitando a infecção a partir da ingestão de roedores ou passariformes contendo bradizoitos do parasita.

Da mesma forma Netto et al. (9), trabalhando com 41 gatos também não domiciliados, encontraram 24,39% de animais soropositivos, resultado superior ao do presente estudo. Galvani et al. (12) avaliando gatos errantes de Marília obtiveram soropositividade em 26%, entretanto, com títulos inferiores aos relatados anteriormente (9). Enfatiza-se que os resultados em animais não domiciliados, deve indicar maior soroprevalência, considerando-se os fatores de risco para a infecção, pela exposição maior com o meio ambiente. Ao se confrontar e interpretar a resposta sorológica é necessário que se observe a técnica utilizada no diagnóstico, uma vez que tanto a sensibilidade como a especificidade são variáveis, interferindo assim, nos resultados (3).

No entanto, Langoni et al. (3), Da Silva et al. (6) e Cruz et al. (11) obtiveram 19,4%, 18,09% e 16,3 % de soropositividade, respectivamente, semelhante ao presente estudo. Enfatiza-se que as condições epidemiológicas desses estudos são semelhantes às desta pesquisa, e que a maioria dos animais utilizados no presente estudo eram bem cuidados e recebiam ração de boa qualidade, fato que provavelmente, apesar dos hábitos de caça e carnivorismo, impedem com que se alimentem da caça, o que diminui os fatores de risco para a infecção.

No presente estudo não houve relação estatística significativa entre a soropositividade e o sexo, raça e procedência, concordando com os resultados de Langoni et al. (3). Galvani et al. (12) analisando 50 gatos errantes da cidade de Marília com maior número de amostras de fêmeas (56%), obtiveram maior soropositividade em machos, sendo que entre os 13 animais positivos, 8 eram machos. O contrário ocorreu no presente estudo, em que apesar do maior número de machos avaliados, obteve-se maior soropositividade entre fêmeas com 6 delas positivas entre os 10 animais, resultado que corrobora com os obtidos por Cruz et al. (11).

Com relação a idade, houve maior frequência da infecção nos animais mais idosos, corroborando com os dados de Langoni et al. (3) e Galvani et al. (12). Com o passar da idade, aumenta-se o risco de infecção pela maior exposição dos animais às formas infectantes do parasita, e no caso dos animais estudados, pelo possível contato com oocistos infectantes ou a partir da ingestão da carne de diferentes espécies animais, contendo bradizoítos de *T. gondii*, fato menos provável, como discutido anteriormente, considerando-se o bom estado nutricional dos animais, e a provável não ingestão da presa.

Avaliando-se a resposta sorológica de acordo com os títulos obtidos, no presente estudo, 60% dos animais positivos apresentaram título 16, concordando com Galvani et al. (12). Por outro lado Langoni et al. (3) e Cruz et al. (11) obtiveram maior resposta para o título 64. Títulos mais baixos de IgG anti-*T. gondii* podem estar relacionados à infecções prévias e deve-se considerar que os felinos se infectam provavelmente nas primeiras semanas de vida, quando os títulos de anticorpos maternos estão em queda e eles iniciam os hábitos de caça, se expondo ao agente.

## CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, obteve-se 10% de animais sororeagentes para anticorpo da classe IgG anti-*T. gondii*, com títulos variáveis de 16 a 256, com maior frequência em fêmeas, e em animais mais velhos.

## REFERÊNCIAS

1. Carneiro BF, Miranda MM, Neto OJS, Linhares GFC, Araújo LBM. Inquérito sorológico para *Toxoplasma gondii* em mamíferos neotropicais mantidos no centro de triagem de animais silvestres, Goiânia, Goiás. Rev Patol Trop. 2014;43(1):69-78.
2. Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 4th ed. Athens: Saunders; 2012.
3. Langoni H, Silva AV, Cabral KG, Cunha ELP, Cutolo AA. Prevalência de toxoplasmose em gatos dos Estados de São Paulo e Paraná. Braz J Vet Res Anim Sci. 2001;38(5):243-4.
4. Araújo FAP, Silva NRS, Olicheski AT, Beck C, Rodrigues RJD, Fialho CG. Anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de gatos internados no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, detectados através da técnica de hemaglutinação indireta. Acta Sci Vet. 2003;31(2):89-92.
5. Galvão ALB, Vaconcellos AL, Navarro IT, Bresciani KDS. Aspectos da toxoplasmose na clínica de pequenos animais. Semin, Cienc Agrar. 2014;35(1):393-410.
6. Da Silva AV, Cutolo AA, Langoni H. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-toxoplasma em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. Arq Inst Biol. 2002;69(1):7-11.



7. Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do município de Jaguapitã, estado do Paraná, Brasil. Cienc Rural. 1999;29(1):99-104.
8. Amendoeira MR, Coutinho SG. Indirect immunofluorescence (IgG and IgM) tests for toxoplasmosis on 203 persons, with no symptomatology suggesting the disease, located in the city of Rio de Janeiro. Serological follow up one to two years later. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1981;76(4):397-407.
9. Netto EG, Munhoz AD, Albuquerque ER, Lopes CWG, Ferreira AMR. Ocorrência de gatos soropositivos para *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (apicomplexa: toxoplasmatinae) na cidade de Niterói, Rio de Janeiro. Rev Bras Parasitol Vet. 2003;12(4):145-9.
10. Pinto LD, Araújo FAP, Stobb NS, Marques SMT. Soroepidemiologia de *Toxoplasma gondii* em gatos domiciliados atendidos em clínicas particulares de Porto Alegre, RS, Brasil. Cienc Rural. 2009;39(8):2464-9.
11. Cruz MA, Ullmann LS, Montañó PY, Hoffmann JL, Langoni H, Biondo AW. Soroepidemiologia de *Toxoplasma gondii* em gatos domiciliados atendidos em clínicas particulares de Porto Alegre, RS, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet. 2011;20(3):256-8.
12. Galvani GD, Vicente BG, Dias LSB. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em *Felis domesticus* errantes em bosque municipal da cidade de Marília, São Paulo, Brasil. Rev Educ Contin Med Vet Zootec. 2014;12(2):28-33.
13. Camargo ME. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev Bras Patol Clin. 1974;10(3):143-69.
14. Zar JH. Biostatistical analysis. 5th ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall; 2009.

**Recebido em: 07/11/2014**

**Aceito em: 19/08/2015**

## HEMATOLOGIA DO *Mylossoma duriventre* (SERRASALMIDAE) DA BACIA DO RIO SOLIMÕES, AMAZÔNIA CENTRAL (BRASIL)

Michel Nasser Corrêa Lima Chamy<sup>1</sup>  
Rafael Pinto Souza<sup>1</sup>  
Anderson Gomes Costa<sup>2</sup>  
Marcos Tavares-Dias<sup>3</sup>

### RESUMO

Este estudo investigou os parâmetros hematológicos de *Mylossoma duriventre* Cuvier, 1817 da bacia do Rio Solimões, estado do Amazonas, Amazônia central, no Brasil. Variações intraespecíficas foram observadas para os parâmetros investigados, mas o hematócrito foi o parâmetro com menor variação. O número de eritrócitos mostrou correlação altamente positiva com o hematócrito. Nas extensões sanguíneas *M. duriventre* foram quantificados e caracterizados linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e leucócitos granular PAS-positivo, mas houve predominância de linfócitos e neutrófilos. Tais leucócitos apresentaram características similares a de outras espécies de serrasalmídeos. Porém, foram observadas variações interespecíficas em alguns parâmetros investigados quando comparados a outros Serrasalmidae e Characidae da literatura. Este foi o primeiro estudo sobre parâmetros hematológicos de *M. duriventre* e os resultados obtidos poderão servir de comparação para outros estudos com esse peixe em outros ambientes.

**Palavras-chave:** Amazônia, peixe de água, sangue, leucócitos.

## HEMATOLOGY OF THE *Mylossoma duriventre* (SERRASALMIDAE) FROM THE SOLIMÕES RIVER BASIN, CENTRAL AMAZON (BRAZIL)

### ABSTRACT

This study investigated the hematologic parameters of *Mylossoma duriventre* Cuvier, 1817 from Solimões River basin, state of Amazonas, central Amazon, in Brazil. In blood parameters occurred intraespecific variations, but the hematocrit is the parameter with lower variation for *M. duriventre*. Erythrocytes number showed positive correlation with the hematocrit. In blood smears of *M. duriventre* were quantified and characterized lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and PAS-positive granular leukocyte, but with predominance of lymphocytes and neutrophils. These leukocytes presented similar characteristic to other species of serralmids. In some parameters of *M. duriventre* there are interspecific variations when compared to other serrasalmids and characid species of the literature. This was the first study on hematological parameters of *M. duriventre*, and results found might be used to comparison in study with this fish in other environment.

**Keywords:** Amazon, freshwater fish, blood, leukocytes.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Amazonas

<sup>2</sup> Embrapa Amapá

<sup>3</sup> Embrapa Amapá, Contato principal para correspondência.

## HEMATOLOGIA DE *Mylossoma duriventre* (SERRASALMIDAE) DE LA CUENCA SOLIMÕES, AMAZONIA CENTRAL (BRASIL)

### RESUMEN

Este estudio investigó los parámetros hematológicos del *Mylossoma duriventre* Cuvier, 1817 en la cuenca del Río Solimões, estado de Amazonas, en Brasil. Se observaron variaciones intraespecíficas de los parámetros investigados, pero el hematocrito fue el parámetro con la menor variación. El número de eritrocitos mostró correlación altamente positiva con el hematocrito. En las extensiones de sangre de *M. duriventre* se cuantificaron y caracterizaron linfocitos, monocitos, neutrofilos, eosinofilos y leucocitos granulares PAS-positivos, mas había un predominio de linfocitos y neutrofilos. Tales leucocitos mostraron características similares a otras especies de serrasalmídeos. Sin embargo, se observó variación interespecífica en algunos parámetros de *M. duriventre* en comparación con otros Serrasalmidae y Characidae de la literatura. Este fue el primer estudio sobre los parámetros hematológicos de *M. duriventre* y los resultados obtenidos pueden servir de comparación con otros estudios con tal pece cuando en otros ambientes.

**Palabras clave:** Amazonia, peces de agua dulce, sangre, leucocitos.

### INTRODUÇÃO

A hematologia vem se tornando uma importante ferramenta nos estudos do status de saúde (1-6) e bem-estar dos peixes (7,8). Os parâmetros eritrocitários podem ser uma maneira rápida de detectar sintomas de estresse, toxicidade e doenças nos peixes (4,6,7,9), além de servir para o conhecimento da capacidade respiratória de cada espécie. Os leucócitos, principais componentes envolvidos na resposta celular mediada (6,9,10), podem fornecer informações importantes sobre o sistema imunológico da população de peixes em seu ambiente. Porém, ainda há poucas informações sobre características sanguíneas de populações naturais (4,5,6,11), principalmente de espécies de peixes da Amazônia. Como não se conhece parâmetros hematológicos do pacu-manteiga *Mylossoma duriventre* Cuvier, 1817, a proposta do presente estudo foi descrever tais parâmetros em espécimes capturados na bacia do Rio Solimões, estado do Amazonas, região da Amazônia central.

Na região amazônica, adultos de *M. duriventre* são capturados em águas abertas e floresta de várzea alagada (Igapós), enquanto os jovens são encontrados na floresta alagada. *Mylossoma duriventre* é um peixe pelágico com hábito alimentar onívoro e variações ontogênicas na alimentação. Nas florestas alagadas, adultos alimentam-se principalmente de folhas, frutos, sementes e pequenos invertebrados terrestres e aquáticos. Os juvenis têm preferência por capim, gramíneas e pequenos moluscos. Esse peixe tem hábito diurno e migrador, assim na vazante migra rio acima para desovar nas confluências dos rios e sua desova é total (12,13).

*Mylossoma duriventre* é um peixe muito apreciado, principalmente, pela população ribeirinha amazônica para alimentação, bem como pela população urbana, assim é uma das espécies comercializadas nos diversos locais da Amazônia brasileira (12). Em 2011, produção extrativista de peixes conhecidos genericamente como pacu, incluindo *Mylossoma* spp. foi de 11.123,9 toneladas (14). Porém, essa espécie economicamente importante para a região amazônica tem sua fisiologia pouco estudada. Assim, o presente estudo fornece relevantes informações sobre a hematologia de população natural de *M. duriventre*, visando contribuir com informações sobre sua fisiologia.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Setenta espécimes de *Mylossoma duriventre* foram coletados na floresta inundada na região do Lago Coari (04° 04' 072''S e 063°10'004''W), um afluente do médio Rio Solimões, no município de Coari, estado do Amazonas (Amazônia central), para análise sanguínea. Todos os peixes foram coletados com redes de malha de 50 e 55 mm (ICMBIO: 11884-1).

Após contenção mecânica dos peixes, foi coletada uma alíquota de sangue por punção do vaso caudal com auxílio de seringas contendo EDTA (10%). Essas amostras de sangue foram usadas na determinação do número de eritrócitos totais, em câmara de Neubauer, concentração da hemoglobina, usando reagente de Drabkin, e leitura em espectrofotômetro em 540 nm de absorvância, e do hematócrito, pelo método do microhematócrito. De posse desses dados, foram calculados os índices hematimétricos de Wintrobe: volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). O sangue foi usado também para confecção de extensões sanguíneas coradas pancromicamente com uma combinação de May Grünwald-Giemsa-Wright, para contagem diferencial de leucócitos em até 200 células de interesse, em cada extensão (9). A determinação do número de leucócitos e trombócitos totais seguiram recomendações prévias (3).

Para cada peixe foram examinados a boca, opérculos, brânquias e trato gastrointestinal, para verificação da presença de parasitos. As brânquias foram removidas para coleta de ectoparasitos. O trato gastrointestinal foi removido examinado para coleta de endoparasitos. A metodologia empregada para procedimentos de coleta, fixação e análise parasitológica seguiu recomendações de Eiras et al. (15). Assim, somente espécimes sem parasitos e lesões macroscópicas foram utilizados neste estudo.

O peso corporal (g) e comprimento total (cm) dos peixes foram usados para calcular a relação peso-comprimento. Para calcular a relação peso-comprimento foi usado a equação  $W_t = aL^b$ , onde  $W_t$  é o peso total em gramas e  $L$  o comprimento total em cm,  $a$  e  $b$  são constantes. Essas constantes foram estimadas pela regressão linear da equação transformada:  $W = \log a + b \times \log L$  (16). O nível de significância do valor  $de b$  foi testado usando teste  $t$  ( $p > 0,05$ ). O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) foi usado para determinar possíveis correlações do número de eritrócitos com o hematócrito e hemoglobina (17).

No momento das coletas dos peixes, a concentração de oxigênio dissolvido na água e temperatura foi determinada usando oxímetro digital. A temperatura variou de 29,6 a 31,1°C e oxigênio dissolvido de 4,1 a 5,3 mg/L

## RESULTADOS

Os espécimes de *M. duriventre* mediram  $19,9 \pm 1,5$  cm e  $210,4 \pm 43,4$  g. A equação que descreve a relação peso-comprimento mostrou crescimento alométrico negativo (Figura 1).

O hematócrito foi o parâmetro eritrocitário com menor variação em *M. duriventris*, enquanto o número de eritrócitos totais e VCM apresentaram as maiores variações (Tabela 1). O número de eritrócitos totais mostrou correlação altamente positiva com o hematócrito (Figura 2). Porém, não houve correlação significativa ( $p > 0,05$ ) da concentração de hemoglobina com o número de eritrócitos ou com o hematócrito dos peixes.

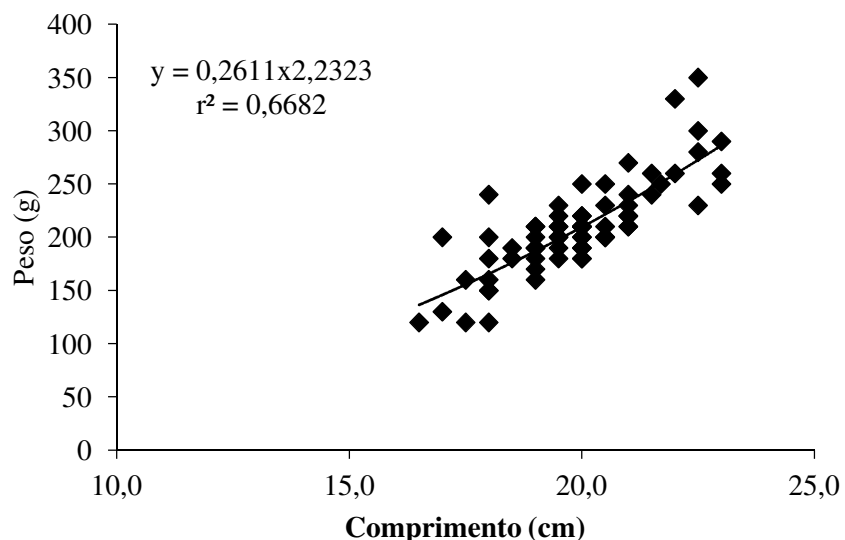


Figura 1. Equação de regressão da relação peso-comprimento em *Mylossoma duriventre* do médio Rio Solimões, estado do Amazonas (Brasil).

Tabela 1. Parâmetros eritrocitários de *Mylossoma duriventre* do médio Rio Solimões, estado do Amazonas (Brasil). DP: Desvio padrão, CV: Coeficiente de variação. VCM: volume corpuscular médio, CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média.

Parâmetros	Média ± DP	Mínimo-Máximo	CV (%)
Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> /μL)	2,215 ± 0,475	0,860-3,410	21,6
Hemoglobina (g/dL)	10,1 ± 1,9	6,4-13,7	19,0
Hematócrito (%)	41,3 ± 4,0	30,0-49,0	9,8
VCM (fL)	193,8 ± 40,7	126,1-383,7	21,1
CHCM (g/dL)	24,5 ± 4,6	13,9-34,6	18,9

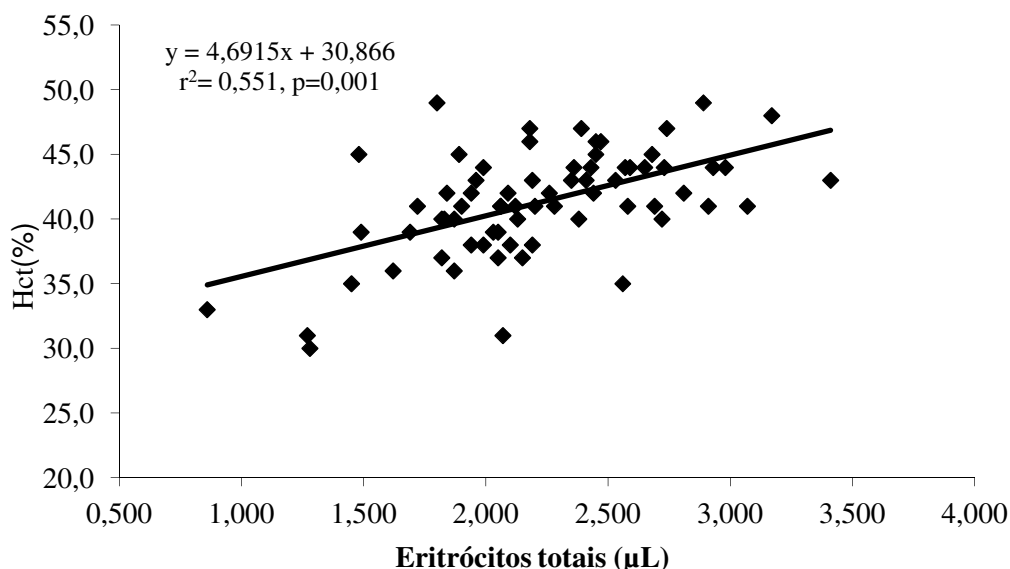


Figura 2. Correlação do número de eritrócitos com o hematócrito de *Mylossoma duriventre* do médio Rio Solimões, estado do Amazonas (Brasil).

Nas extensões sanguíneas de *M. duriventre* foram identificados eritrócitos, trombócitos, linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e leucócitos granular PAS-positivos (LG-PAS).

Trombócitos são células fusiformes, com citoplasma hialino e sem granulações. O núcleo ocupa boa parte da célula e acompanha o formato dela (Figura 3A). Os linfócitos, em sua maioria, são arredondados, apresentam tamanho variado e citoplasma basofílico. O núcleo possui forma arredondada, sendo grande a sua relação com citoplasma e não evidencia granulações (Figura 3B). Os monócitos são células maiores que os linfócitos, têm formato esférico e citoplasma basofílico geralmente com vacúolos. Em geral, o núcleo é arredondado (Figura 3C) e ocasionalmente apresenta forma de ferradura. Neutrófilos são células com citoplasma contendo ricas granulações neutrofílicas finas, núcleo geralmente na forma de bastonete (Figura 3D) e raramente na forma segmentada. Os eosinófilos são células com citoplasma rico em granulações eosinofílicas e o núcleo tem forma de bastonete (Figura 3E), em sua maioria. Os LG-PAS possuem citoplasma rico em granulações transparentes grosseiras, com núcleo pequeno, em geral periférico (Figura 3F).

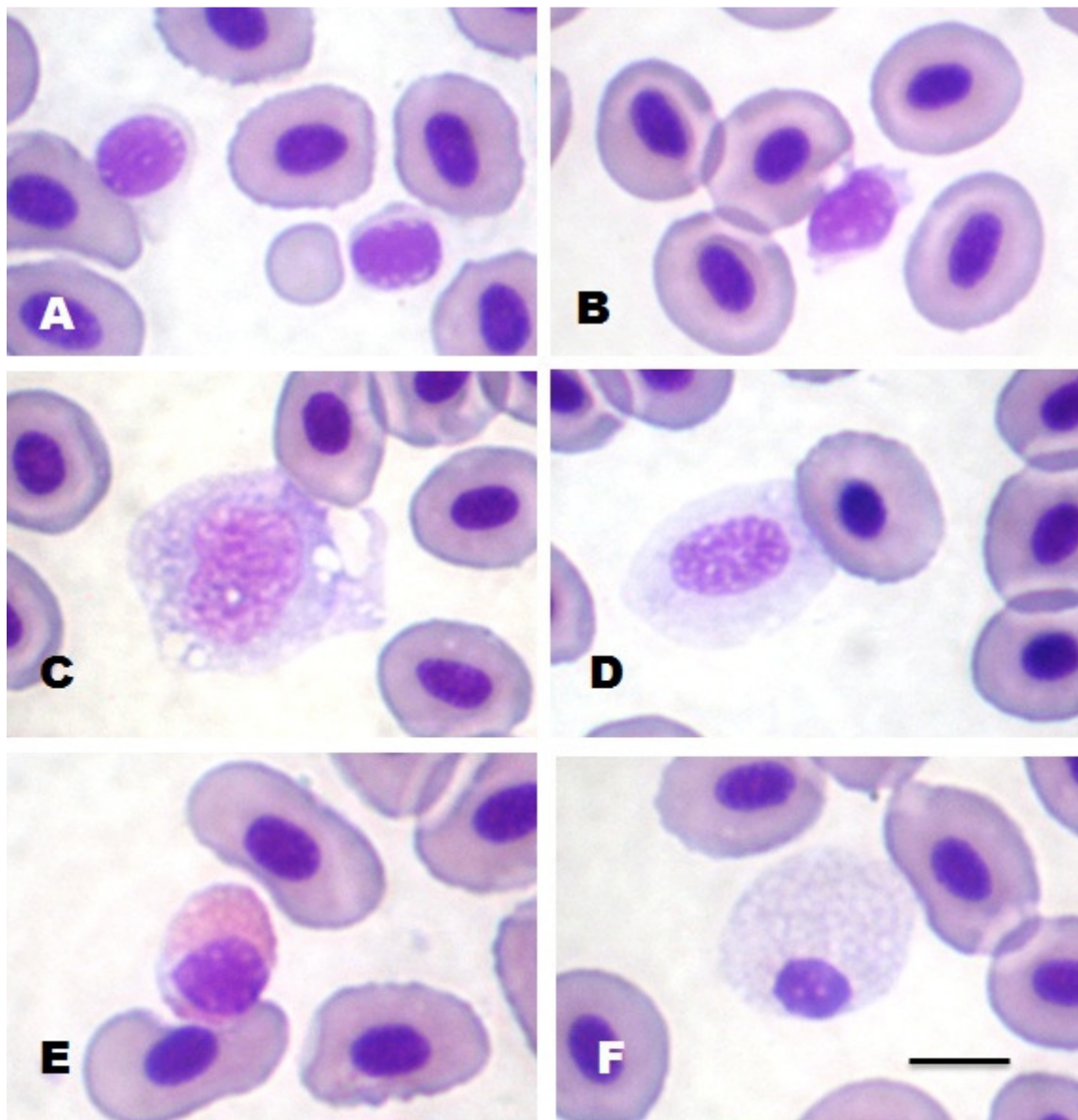


Figura 3. Células do sangue de *Mylossoma duriventre* do médio Rio Solimões, estado do Amazonas (Brasil), coradas com May Grünwald-Giemsa-Wright. (A) trombócitos, (B) linfócitos, (C) monócito, (D) neutrófilo, (E) eosinófilo e (F) leucócito granular PAS-positivo. Barra de escala: 5,0  $\mu\text{m}$ .

Trombócitos totais, leucócitos totais e linfócitos totais foram células com menor variação, enquanto eosinófilos foram os leucócitos com maior variação. Linfócitos foram os leucócitos com maior frequência, enquanto monócitos apresentaram a menor frequência relativa e absoluta (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros sanguíneos de *Mylossoma duriventre* do médio Rio Solimões, estado do Amazonas (Brasil). DP: Desvio padrão, CV: Coeficiente de variação, LG-PAS: Leucócitos granular PAS-positivo.

Parâmetros	Média ± DP	Mínimo-Máximo	CV (%)
Trombócitos (µL)	62.391± 50.516	6.020-315.900	81,5
Leucócitos (µL)	26.650 ± 15.151	4.260-91.080	57,3
Linfócitos (µL)	18.328 ± 11.504	763-50.869	62,0
Linfócitos (%)	67,0 ± 17,9	5,0-97,0	26,9
Monócitos (µL)	560 ± 762	0-3.185	140,4
Monócitos (%)	2,4 ± 3,1	0-15,0	133,4
Neutrófilos (µL)	4.142 ± 6590	215-46.451	159,2
Neutrófilos (%)	16,2 ± 15,5	1-72,0	96,7
Eosinófilos (µL)	1.734 ± 2.914	0-12.621	169,2
Eosinófilos (%)	7,6 ± 12,9	0-82,0	170,4
LG-PAS (µL)	1.781 ± 2.091	0-13.114	118,3
LG-PAS (%)	6,8 ± 6,8	0-32,0	100,4

## DISCUSSÃO

Crescimento do tipo alométrico negativo de *M. duriventre* indicou maior incremento em massa corporal que em comprimento, a exemplo que foi relatado por Ruffino e Isaac (18), para esse mesmo peixe do Rio Amazonas. A relação peso-comprimento pode ser usada para estimar o peso do peixe quando o seu comprimento é conhecido (18,19), assim pode fornecer informações relevantes para a biologia pesqueira.

Durante as pesquisas de campo com peixes, muitas vezes, não é possível realizar rapidamente a contagem de eritrócitos e determinação da concentração de hemoglobina. Assim, pelo estabelecimento das correlações entre a contagem de eritrócitos e hemoglobina, e entre esses o hematócrito, que é mais simples e rápido de se executar, pode ser estimado o número de eritrócitos e hemoglobina, quando o coeficiente de correlação ( $r$ ) for elevado. Porém, biologicamente, considera-se válido somente os coeficientes acima de 0,50 (6,19,20), como ocorreu na correlação entre o número de eritrócitos totais e o hematócrito em *M. duriventre*.

O número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina de *M. duriventre* do Rio Solimões foram similares aos descritos para *S. affinis* (Characidae) do Ríó Sinú. Porém, foram diferentes daqueles relatados para *P. mesopotamicus* e *C. macropomum*, *B. orbignyanus* e *B. amazonicus* (Serrasalmidae) provenientes de cultivo intensivo, enquanto o VCM e CHCM foram similares (Tabela 3). Nos peixes, uma característica comum é a variação interespecífica nos parâmetros eritrocitários que podem estar associadas a fatores internos e externos, tais como qualidade do ambiente aquático, temperatura, nível de oxigênio, sazonalidade, sexo, nutrição, estágio de maturação gonadal, idade, estado nutricional, estresse de captura e manipulação e procedimentos de amostragem (1,4,5,6,21), bem como às necessidades metabólicas de cada espécie.

Tabela 3. Valores médios do eritrograma de diferentes espécies de peixes da literatura. RBC: Eritrócitos totais; Hb: hemoglobina; Hct: Hematócrito; VCM: Volume corpuscular médio; CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média; -: sem informação.

Espécie de peixe/Ambiente	RBC (x 10 <sup>6</sup> /μL)	Hb g/dL)	Hct (%)	VCM (fL)	CHCM (g/dL)	Referências
<i>Piaractus mesopotamicus</i> /cultivo	2,964	8,9	31,9	125,0	28,7	Tavares-Dias e Mataqueiro(21)
<i>Piaractus mesopotamicus</i> /cultivo	1,670	7,3	29,5	176,5	25,0	Ranzani-Paiva et al. (1)
<i>Colossoma macropomum</i> /cultivo	1,529	5,6	25,4	166,9	22,2	Ranzani-Paiva et al. (1)
<i>Colossoma macropomum</i> /cultivo	2,831	11,8	41,6	150,0	27,7	Tavares-Dias e Sandrim (19)
<i>Colossoma macropomum</i> /cultivo	1,580	7,2	34,0	--	21,5	Seibert et al. (22)
<i>Colossoma macropomum</i> /cultivo	1,190	9,94	29,8	288,1	33,3	Centeno et al. (24)
<i>Brycon amazonicus</i> /cultivo	2,915	10,9	39,0	134,8	28,8	Tavares-Dias et al. (23)
<i>Brycon orbignyanus</i> /cultivo	3,383	10,7	40,2	125,0	26,9	Tavares-Dias e Moraes (3)
<i>Brycon amazonicus</i> /cultivo	1,270	6,6	28,0	220,0	24,0	Tavares-Dias et al. (5)
<i>Salminus affinis</i> /natural	2,200	12,5	36,2	163,8	35,0	Atencio-García et al. (4)
<i>Mylossoma duriventre</i> /natural	2,215	10,1	41,3	193,8	24,5	Presente estudo

Em *M. duriventre*, houve elevada variação intraespecífica no número de trombócitos, a exemplo de *P. mesopotamicus* (21) e *B. amazonicus* (5). Além disso, o número de trombócitos em *M. duriventre* foram similares aqueles relatados para *P. mesopotamicus* (21), mas foram menores que os descritos para *B. amazonicus* (5), ambos de cultivo. Tais variações são esperadas, pois como os trombócitos atuam primariamente na coagulação sanguínea e ainda contribuem na defesa dos peixes (3,5), esses estão em constante movimentação, entre os órgãos hematopoéticos (baço e rim) e a circulação (2,21).

Linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e leucócitos granular PAS-positivo foram os leucócitos identificados no sangue de *M. duriventre*, similarmente ao relatado para *C. macropomum* (1) e *S. affinis* (4). Houve uma predominância de linfócitos, seguida por neutrófilos em *M. duriventre*, indicando que tais granulócitos constituem a barreira primária de defesa nesse peixe (9-11). Porém, a composição dos granulócitos sanguíneos é muito variável entre os peixes, pois somente algumas espécies apresentam LG-PAS-positivo, enquanto eosinófilos e basófilos ocorrem raramente (2).

Houve elevada variação no número de leucócitos totais em *M. duriventre*, pois neutrófilos e monócitos são células em constante movimentação entre a circulação e os tecidos, devido a sua importante participação nos processos inflamatórios juntamente com outros granulócitos. Além disso, os teleósteos têm memória imunológica com acelerada e melhorada resposta anticórpica secundária, bem como aumentada sensibilidade aos antígenos (10). Em *M. duriventre*, o número de leucócitos foi maior que em outras espécies de Serrasalmidae e Characidae (Tabela 4). O número de leucócitos circulantes varia entre as espécies de peixes em função da idade, sexo, sazonalidade, estado nutricional, doenças (2,3,9), bem como do método de análise.



Tabela 4. Valores médios da contagem de trombócitos totais e leucócitos em espécies de peixes da literatura. LG-PAS: Leucócitos granular PAS-positivo. – Célula não encontrada.

Parâmetros	Espécie de peixe					Presente estudo
	<i>Piaractus mesopotamicus</i> Tavares-Dias e Mataqueiro (21)	<i>Piaractus mesopotamicus</i> Ranzani-Paiva et al. (1)	<i>Brycon amazonicus</i> Tavares-Dias et al. (5)	<i>Colossoma macropomum</i> Ranzani-Paiva et al. (1)	<i>Salminus affinis</i> Atencio-García et al. (4)	
Trombócitos (µL)	56.584	-	30.692	-	25.400	62.391
Leucócitos (µL)	8.731	-	13.324	-	6.100	26.650
Linfócitos (µL)	10.261	-	5.680	-	-	18.328
Linfócitos (%)	54,1	35,8	38,9	78,8	68,8	67,0
Monócitos (µL)	1.946	-	2.156	-	-	560
Monócitos (%)	10,3	5,9	13,9	2,5	2,1	2,4
Neutrófilos (µL)	1.695	-	5.377	-	-	4.142
Neutrófilos (%)	10,9	1,3	47,2	2,1	28,4	16,2
LG-PAS (µL)	1.953	-	0	-	-	1.781
LG-PAS (%)	9,9	0,8	0	0,9	-	6,8
Eosinófilos (µL)	1.296	-	0	-	-	1.734
Eosinófilos (%)	6,7	55,6	0	13,5	0,3	7,6
Basófilos (µL)	39,0	-	-	-	-	-
Basófilos (%)	0,3	-	-	-	0,4	-

## CONCLUSÃO

Esta primeira contribuição sobre parâmetros sanguíneos de *M. duriventre* indica que os resultados obtidos podem ser utilizados para comparação em estudos futuros dessa espécie em outros ambientes. Porém, estudos devem ser conduzidos para uma melhor compreensão do seu perfil sanguíneo, bem como para determinação dos valores de referências para *M. duriventre*.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido de acordo com os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os autores são gratos ao CNPq, pela Bolsa Produtividade (PQ) concedida a Tavares-Dias, M.

## REFERÊNCIAS

1. Ranzani-Paiva MJT, Salles FA, Eiras JC, Eiras AC, Ishikawa CM, Alexandrino AC. Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. Bol Inst Pesca. 1998/1999;25:77-83.
2. Tavares-Dias M, Moraes FR. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: Villimpress; 2004.
3. Tavares-Dias M, Moraes FR. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. Hidrobiologica. 2006;16:271-4.
4. Atencio-García V, López FG, Mendoza DM, Carrasco SP. Hematología y química sanguínea de juveniles de rubio (*Salminus affinis* Pisces: Characidae) del Río Sinú. Acta Biol Colomb. 2007;12:27- 40.

5. Tavares-Dias M, Affonso EG, Oliveira SR, Marcon JL, Egami MI. Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix end Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) whit others Bryconinae species. *Acta Amazon.* 2008;38:799-806.
6. Tavares-Dias M, Ishikawa MM, Martins ML, Satake F, Hisano H., Pádua SB. et al. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: Saran-Neto A, Mariano WS, Soria SFP. Tópicos especiais em saúde e criação animal. São Carlos: Pedro & João Editores; 2009. p.43-80.
7. Poli MB. Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality. *Ital J Anim Sci.* 2009;8:139-60.
8. Ozovehe BN. Growth performance, haematological indices and some biochemical enzymes of juveniles *Clarias gariepinus* (Bruchel 1822) fed varying levels of *Moringa oleifera* leaf meal diet. *J Aquac Res Dev* [Internet]. 2013 [cited 2013 Feb 23]. Available from: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000166>.
9. Ranzani-Paiva MJT, Pádua SB, Tavares-Dias M, Egami MI. Métodos para análises hematológicas em peixes. Maringá: Eduem; 2013.
10. Fletcher TC, Secombes CJ. Immunology of fish. eLS [Internet]. 2010 [cited 2010 Apr 10]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0000520.pub2/full>].
11. Santos RBS, Tavares-Dias M. Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (Pisces, Doradidae) oriundos da bacia do médio Rio Solimões, estado do Amazonas (Brasil), naturalmente parasitados. *Bol Inst Pesca.* 2012;36:28-292.
12. Soares MGM, Costa EL, Siqueira-Souza FK, Anjos HDB, Yamamoto KC, Freitas CEC. Peixes de lagos do médio Rio Solimões. Manaus: Instituto Piatam; 2011.
13. Froese R, Pauly D. Editors. FishBase [Internet].2013 [cited 2013 Apr 10]. Available from: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).
14. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília, DF; 2013.
15. Eiras JC, Takemoto RM, Pavanelli GC. Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Maringá: EDUEM; 2006.
16. Le-Cren ED. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *J Anim Ecol.* 1951;20:201-19.
17. Zar JH. Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice Hall; 2010.
18. Ruffino ML, Isaac VJ. Life cycle and biological parameters of several Brazilian Amazon fish species. *Naga.* 1995;18:41-5.

19. Tavares-Dias M, Sandrim EFS. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. I. Série vermelha e dosagens de cortisol e glicose do plasma sanguíneo de espécimes de *Colossoma macropomum* em condições de cultivo. *Acta Scientiarum*. 1998;20:157-60.
20. Ranzani-Paiva MJT. Características sanguíneas da pirapitinga do sul, *Brycon* sp., sob condições experimentais de criação intensiva. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1991;141-53.
21. Tavares-Dias M, Mataqueiro MI. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. *Acta Sci Biol Sci*. 2004; 26:157-62.
22. Seibert CS, Guerra-Shinohara EM, Carvalho EG, Marques EE. Red blood cell parameters and osmotic fragility curve of *Colossoma macropomum* (Pisces, Osteichthyes, Mileinae) in captivity. *Acta Scientiarum*. 2001;23:515-20.
23. Tavares-Dias M, Frascá-Scorvo CMD, Campos-Filho E, Moraes FR. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã *Brycon cephalus* Gunther, 1869 (Osteichthyes: Characidae). *Ars Veterinária*. 1999;15:149-53.
24. Centeno L, Silva-Acuña R, Barrios R, Lugo RS, Matute C, Pérez JL. Hematological characteristics of cachama (*Colossoma macropomum*) in three phases of the growth in Delta Amacuro, Venezuela. *Zootecnia Trop*. 2007; 25: 237-243.

**Recebido em: 02/05/2014**

**Aceito em: 25/09/2015**

**PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO OMENTO MAIOR, TECIDO ADIPOSEO PERIRRENAL E BOLSA ADIPOSEA INTERESCAPULAR EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho<sup>1\*</sup>  
Tiago Luis Eilers Treichel<sup>1</sup>  
Jaime Sardá Aramburú Junior<sup>1</sup>  
Maurício Borges da Rosa<sup>1</sup>  
Maurício Veloso Brun<sup>2</sup>  
Marcella Teixeira Linhares<sup>3</sup>  
Bianca Eidt Rodrigues<sup>4</sup>  
Alexandre Krause<sup>2</sup>  
Marcos André Braz Vaz<sup>5</sup>  
Fabíola Dalmolin<sup>1</sup>  
Ney Luis Pippi<sup>2</sup>

**RESUMO**

O tecido adiposo é fonte alternativa de células-tronco mesenquimais, apresentando-se como método menos invasivo e permitindo coleta de maior quantidade celular em comparação a medula óssea (MO). Nos humanos, o tecido adiposo apresenta diferenças de metabolismo, conforme a localização anatômica. Em camundongos, foram observadas diferenças em relação à composição celular e à capacidade de diferenciação das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs), de acordo com as regiões anatômicas. O objetivo deste trabalho é comparar a proliferação e viabilidade de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da bolsa adiposa interescapular, do omento maior e da gordura da região perirrenal de coelhos. Para isso, três coelhos foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para remoção de tecido adiposo do omento maior, região perirrenal e bolsa adiposa interescapular. As células foram processadas e cultivadas em atmosfera umidificada a CO<sub>2</sub> 5%, sendo posteriormente coradas com Azul de Tripán e contadas em câmara de Neubauer. Concluí-se que houve variação na capacidade proliferativa das CTMs em relação as regiões estudadas, com vantagem da gordura omental sobre as outras duas regiões. A viabilidade das CTMs das três regiões apresentou variação durante as passagens.

**Palavras-chave:** terapia celular, cirurgia, coelhos, CTM.

**PROLIFERATION AND VIABILITY OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS DERIVED FROM OMENTUM, FAT PERIRENAL AND ADIPOSE INTERSCAPULAR POUCH IN RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*)**

**ABSTRACT**

Adipose tissue is an alternative source of mesenchymal stem cell. It can be obtained by less invasive method and in larger quantities when compared with bone marrow. In humans, adipose tissue metabolism differs according to anatomic location. In mice, according to the

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) \*Correspondência. Rua João Batista da Cruz Jobim, 115/203 – Santa Maria, RS. 97060-330. saulovet2011@hotmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM.

<sup>3</sup> Programa de Residência Multiprofissional e em Área Profissional da Saúde, UFSM.

<sup>4</sup> Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, UFSM.

<sup>5</sup> Programa de Pós-graduação em Zootecnia, UFSM.

anatomical regions, differences were observed in cellular composition and differentiation capacity of adipose-derived stromal cells (ADSCs). The objective of this study is to compare the viability and proliferation of mesenchymal stromal cells (MSC) derived from the bag interscapular fat, omental and perirenal fats of rabbits. For this, three rabbits were undergone to surgical collect fat from difference sites. Cells were processed and grown in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, and subsequently they were stained with Trypan blue and counted in a Neubauer chamber. It was concluded that there was variation in the proliferative capacity of MSCs over the regions studied, with advantage of great omental fat about the other regions. The viability of MSCs from the three regions showed variation during passages.

**Keywords:** cell therapy, surgery, rabbits, MSC.

## **PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DERIVADAS DEL ESTROMA MESENQUIMAL DE EPIPLÓN, EL TEJIDO ADIPOSITO PERIRRENAL Y EL BOLSO DE GRASA INTERESCAPULAR EN CONEJOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

### **RESUMEN**

El tejido adiposo es una fuente alternativa de células madre mesenquimales, se presenta como el número de aumento de la colección de células menos invasiva y permitiendo comparación con el método de la médula ósea (MO). En los seres humanos, el metabolismo del tejido adiposo difiere de acuerdo con la localización anatómica. En ratones, se observaron diferencias en la composición celular y la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSC), de acuerdo a las regiones anatómicas. El objetivo de este estudio es comparar la proliferación y la viabilidad de las células mesenquimales estromales multipotentes (CTMs) derivados de la bolsa de grasa interescapular, el epiplón mayor y la grasa perirrenal de conejos. Para esto, tres conejos fueron sometidos a cirugía para la extirpación de un tejido adiposo omental, perirrenal y interescapular abultada bolsa. Las células se procesaron y se cultivaron en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>, y posteriormente se tiñeron con azul de tripano y se contaron en una cámara de Neubauer. Llegamos a la conclusión de que hubo una variación en la capacidad proliferativa de CTMs con respecto a las regiones estudiadas, con la ventaja de la grasa omental en las otras dos regiones. La viabilidad de CTMs las tres regiones mostró variación durante los pasajes.

**Palabras clave:** terapia celular, cirugía, conejos, células madre mesenquimales.

### **INTRODUÇÃO**

As células-tronco mesenquimais (CTMs) foram isoladas inicialmente em 1976, como células da medula óssea com capacidade de formar unidades de colônia semelhantes a fibroblastos *in vitro* (CFU-F) (1). Em 1991 o termo CTM foi definido como uma célula capaz de dar origem a outras linhagens celulares diferentes da sua origem (2). Em 2005, padronizando a nomenclatura, o Comitê de Células-tronco Mesenquimais e dos Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) definiu as características das CTMs como: devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em cultura; devem expressar CD105, CD73 e CD90, e não expressar os marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 $\alpha$  ou CD19 e HLA-DR; devem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (1).

As MSCs são consideradas linhagem de células-tronco somáticas, estando presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo na

medula óssea (MO), no tecido adiposo, no periósteo, no tecido muscular e nos órgãos parenquimatosos. A MO constitui um dos principais sítios doadores dessas células, assim como de células-tronco hematopoiéticas e endoteliais. As MSCs caracterizam-se como população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras. Tais características de plasticidade sugerem que as MSCs são responsáveis pela renovação e manutenção de todos os tecidos do organismo. Elas tornaram-se foco de numerosas pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular (3,4).

O tecido adiposo (TA) é fonte celular alternativa de MSCs, a qual pode ser obtida por um método menos invasivo e em maiores quantidades do que na MO. Tem sido demonstrado que o TA contém células-tronco semelhantes as da MO, denominadas de lipoaspirado processado (LAP). Em humanos, estas células podem ser isoladas em grande número a partir de lipoaspirações cosméticas e facilmente cultivadas, inclusive com condições de cultura de tecidos. A capacidade de diferenciação em multilinhagens destas células foi confirmada por pesquisas (5).

Pereira et al. (6), objetivando definir protocolos específicos para a extração e quantificação de células tronco mesenquimais a partir de tecido adiposo excisado em coelhos Nova Zelândia, realizaram lipectomia em bloco na região dorsal, 5cm caudal a região occipital. Os autores concluíram que o protocolo seguido mostrou-se de fácil reprodutibilidade, com poucas situações que possam gerar contaminação da amostra e com pequenas repercussões para os animais, mostrando-se factível para a obtenção de células-tronco a partir de tecido adiposo.

Com o objetivo de estabelecer modelo experimental versátil e que satisfizesse várias áreas de interesse, Torres (7) propôs o coelho como fonte de de tecido adiposo, utilizando como local de coleta a bolsa adiposa interescapular. O pesquisador concluiu que o coelho da raça Nova Zelândia pode ser considerado um modelo adequado pelo grande e localizado acúmulo de tecido adiposo. O autor afirma que a captação tecidual por lipoaspiração é rápida, eficaz e com baixa morbidade, além de que a bolsa adiposa interescapular apresenta quantidade significativa de tecido adiposo.

Kern et al. (5) compararam as MSCs derivadas da MO, TA (ADSCs) e sangue do cordão umbilical (SCU) em relação a morfologia, taxa de sucesso de isolamento, frequência da colônia, potencial de expansão, a capacidade de diferenciação múltipla e o fenótipo imunológico. Os autores verificaram que as células derivadas do SCU e TA são alternativas atraentes à MO para isolamento. O TA contém MSCs com maior frequência e o SCU parece ser mais vantajoso em relação ao potencial de expansão destas células.

Nos humanos, o tecido adiposo apresenta diferenças de metabolismo, conforme a localização anatômica. Em camundongos, pesquisadores observaram diferenças em relação à composição celular e à capacidade de diferenciação das ADSCs, de acordo com as regiões anatômicas (8). Assim, parece provável que o tecido adiposo humano seja composto de diferentes subtipos de células-tronco, dependendo da localização anatômica. No entanto, são necessários mais estudos comparativos acerca da natureza celular e do potencial de diferenciação das ADSCs isoladas do tecido adiposo de regiões anatômicas distintas, com atenção, também, ao tipo de procedimento cirúrgico e/ou laboratorial empregado (9).

Segundo Prunet-Marcassus et al. (10), tecidos adiposos branco e marrom são amplamente reconhecidos como diferentes em termos de metabolismo e composição celular. Os depósitos de tecido adiposo branco de sítios anatômicos diferentes, especialmente do espaço subcutâneo em relação aos sítios internos, também exhibe propriedades metabólicas e funções diferentes. Os autores concluíram em seus estudos que o tecido adiposo aparece como tecido complexo, composto de subconjuntos de células diferentes de acordo com a natureza e o local anatômico. Também sugerem que outras investigações deste tipo levarão ao

surgimento de novas idéias fundamentais para fazer progredir o conhecimento da biologia do tecido adiposo.

Sakaguchi et al. (11) compararam as propriedades de células-tronco mesenquimais (MSCs) humanas, derivadas do osso, da medula óssea, da sinóvia, do periósteo, do músculo esquelético e do tecido adiposo. Entre as propriedades avaliadas estavam rendimento e capacidade de expansão celular. Os autores demonstraram diferenças significativas nas propriedades estudadas dependendo da fonte de origem. Estes resultados podem fornecer informações importantes na escolha do tecido mesenquimal ideal como fonte de células, potencializando sua utilidade clínica.

O objetivo deste trabalho é comparar a proliferação e viabilidade de CTMs após coleta de gordura do omento maior, região perirrenal e da bolsa adiposa interescapular em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a elaboração do estudo foram utilizados três coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), machos adultos, raça Nova Zelândia Branco, clinicamente sadios, com peso médio de 3,33kg, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Todos os animais foram alojados em gaiolas individuais, por um período mínimo de 15 dias para sua adaptação às condições ambientais e ao convívio humano, bem como para a detecção de possíveis enfermidades. Durante todo o período do experimento, os animais permaneceram em ambiente climatizado, recebendo ração e água a vontade.

Após o período de adaptação dos animais, os mesmos foram separados e identificados em três unidades experimentais (C1, C2 e C3), para posterior coleta da gordura dos locais previamente determinados. Os três animais foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos para coleta de tecido adiposo. Os locais previamente escolhidos foram a bolsa adiposa interescapular, o omento maior e a gordura perirrenal (Tabela 1). Logo após os procedimentos, realizados no mesmo dia e turno, o tecido adiposo coletado foi encaminhado para processamento, posterior cultura celular, quantificação e verificação da viabilidade celular.

Tabela 1 - Quantidade (g) de tecido adiposo coletado do omento maior, região perirrenal e bolsa adiposa interescapular de coelhos Nova Zelândia.

Animal/locais	Omento	Região perirrenal	Bolsa adiposa interescapular
C1 (3,67kg)	3	4	5
C2 (3,12kg)	3	4	6
C3 (3,38kg)	2	4	6

No período anterior ao procedimento cirúrgico, os animais foram pesados e submetidos à tricotomia ampla, da cavidade abdominal e região interescapular para a realização da coleta da gordura.

A medicação pré-anestésica constituiu-se de associação de cloridrato de cetamina (20 mg kg<sup>-1</sup>) e maleato de midazolam (2 mg kg<sup>-1</sup>) por via intramuscular (IM). A analgesia foi realizada com cloridrato de tramadol (6 mg kg<sup>-1</sup>, IM), anteriormente ao procedimento. A seguir, os animais foram encaminhados para o bloco cirúrgico do Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE) da UFSM. A indução anestésica foi realizada por meio de máscara e vaporização com isoflurano. Já a manutenção, realizou-se com isoflurano vaporizado em 100% de O<sub>2</sub> ao efeito, com uso de máscara via sistema inalatório aberto, mantendo-se a respiração espontânea.

O procedimento para coleta de gordura abdominal foi realizado por meio de incisão retro-umbilical com bisturi, passando pelo tecido subcutâneo e chegando-se a linha Alba. A seguir, os músculos retos abdominais foram reparados com duas pinças de Allis, permitindo a incisão da linha Alba com bisturi e ampliação do acesso com tesoura de Metzenbaum. Na sequência, a partir de dissecação romba, coletou-se o tecido adiposo do omento maior e da gordura perirrenal. A sutura da linha alba foi realizada com poliglactina 910 3-0 em padrão isolado tipo Sultan, sendo o espaço subcutâneo reduzido com o mesmo material e em padrão contínuo simples. A sutura cutânea foi obtida com náilon 4-0 em padrão de Wolff. A seguir, o animal foi mudado de decúbito para o esternal, a fim de coletar-se a gordura da bolsa adiposa interescapular. O fragmento de tecido adiposo foi obtido por meio de incisão na linha média dorsal do animal, na região interescapular. Após identificação do tecido adiposo, o mesmo foi dissecado com pinças de Halsted e seccionado com tesoura de Metzenbaum. O espaço subcutâneo foi reduzido com fio absorvível sintético de poliglactina 910 3-0, em padrão isolado simples. Já a sutura cutânea foi obtida com mononáilon 4-0, com pontos de Wolff.

Os fragmentos de TA colhidos foram imediatamente depositados em recipientes de vidro, estéreis, contendo 150 mL de solução de Hanks (Sigma-Aldrich®) cada. Os frascos com os tecidos foram pesados ainda no interior da sala cirúrgica, identificados e encaminhados, de modo asséptico, para o Laboratório de Terapia Celular Regenerativa. Os animais utilizados foram submetidos à eutanásia após os procedimentos de coleta do tecido adiposo. A eutanásia foi realizada por meio de injeção com propofol ( $8\text{mg kg}^{-1}$ , IV) ou até a obtenção de parada cardiorespiratória.

Todo o procedimento foi realizado de forma asséptica, com os materiais esterilizados por autoclavagem, radiação ou filtração. No interior de uma capela de fluxo laminar, o recipiente contendo o fragmento de TA foi aberto e, com uma pinça de dissecação, transferiu-se o tecido para uma placa de Petri. Com o auxílio de tesoura, a gordura foi seccionada várias vezes, em diversos fragmentos menores, até não ser mais possível sustentá-la com a pinça de dissecação.

Os pequenos fragmentos de TA foram lavados com solução de Hanks, utilizando-se peneira a fim de impedir a passagem dos fragmentos de gordura. A seguir, a gordura foi transferida para tubos Falcon de 50 mL e, adicionou-se a mesma, uma solução de 1 mg/mL de colagenase tipo II (Sigma-Aldrich®), na proporção 1:3 (volume:volume). Os tubos foram tampados e lacrados com uma película semi-transparente e encaminhados para o banho-maria. Estes permaneceram no banho-maria a uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  e eram agitados manualmente, a cada cinco minutos. Nestas condições, a colagenase promovia a digestão do colágeno, permitindo que diversos tipos celulares fossem liberados do tecido, condição que gerava aspecto leitoso após, aproximadamente, 25 minutos. Passado este período, os tubos foram retirados do banho-maria e encaminhados novamente para a capela de fluxo laminar. Dada a citotoxicidade da colagenase, a mesma era neutralizada através da adição de meio completo, em um volume de 1:1.

A seguir, os tubos com o TA e o meio completo eram centrifugados a 600 G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. Na sequência, realizou-se agitação manual vigorosa dos tubos, objetivando-se romper os adipócitos e promover a liberação de maior número de células mononucleares. Após, os tubos foram recolocados na centrífuga, por mais cinco minutos, com a mesma rotação.

O sobrenadante foi descartado e a fração lavada com meio completo DMEM (Sigma-Aldrich®) e centrifugada, desta vez, a 440 G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante, contendo a fração adipocitária, foi desprezado, e o botão celular, contendo a fração vascular estromal (FVE), ressuspensionado em DMEM (Sigma-Aldrich®) contendo 10% de SFB. A seguir, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura primária de  $75\text{cm}^2$ , com DMEM e 10% de SFB. As garrafas foram então encaminhadas para estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , com concentração de 5% de dióxido de carbono, local em



que permaneceram a fim de se expandirem (Figura 1), sendo a troca do meio realizada após 48 horas.

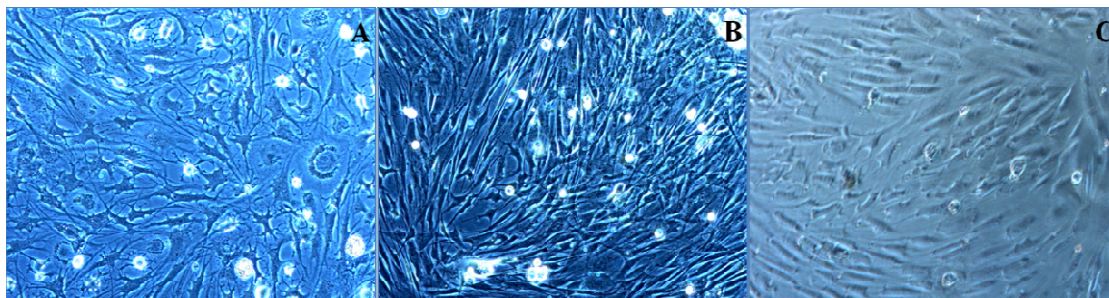


Figura 1. CTMs derivadas do tecido adiposo do omento maior (A), região perirrenal (B) e bolsa adiposa interescapular (C) de coelhos Nova Zelândia, durante o período de expansão a 37°C em CO<sub>2</sub>.

As células foram submetidas a cinco passagens, uma a cada sete dias, sendo em cada uma, realizada a quantificação e análise da viabilidade. A contagem das células foi realizada na Câmara de Neubauer nos quadrantes laterais, de acordo com a somatória do número celular em cada quadrante. Posteriormente, foi multiplicada por 10<sup>4</sup> obtendo assim o número exato de células. Procedeu-se então a coloração destas células com o corante *Trian Blue* a fim de verificar quanto a vitalidade. Na oportunidade, pela observação das garrafas de cultivo, verificou-se a viabilidade celular, bem como a presença de contaminação por fungos ou bactérias.

As células da terceira passagem, em suspensão, foram fixadas em 4% de PFA em PBS por 20 minutos. Sequencialmente, as amostras foram incubadas em PBS contendo 3% de SFB para bloqueio dos sítios inespecíficos por 20 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas nessa mesma solução com os anticorpos anti-CD105 PerCPCy5.5, anti-CD90 PE, anti-CD45 FITC e anti-CD73 FITC nas diluições recomendadas pelo fabricante, a saber, 5:100, 5:100, 20:100 e 10:100, respectivamente. Após 30 minutos de incubação com os anticorpos a temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 400mL de PBS para aquisição dos dados no citômetro de fluxo BD FACSDiva (BD Bioscience). Foram adquiridas no mínimo 30.000 células por amostra, identificadas no *gate* do *dot-plot* do canal de dispersão frontal (FSC – *forward scatter* - fornece informações sobre o tamanho celular) versus o canal de dispersão lateral (SSC – *side scatter* - fornecem informações sobre a granulidade). As análises foram realizadas no *software* FlowjoV10. A amostra negativa consistiu de células não expostas aos anticorpos. A partir dessa amostra traçaram-se os quadrantes onde eventos observados além do quadrante inferior esquerdo (contendo a amostra negativa) foram considerados positivos. Outros controles foram também utilizados para a compensação dos detectores do citômetro.

Todos os dados foram submetidos ao teste estatístico Shapiro-Wilk (5%), para verificação de normalidade. Utilizou-se também o teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney para comparar dois a dois, as médias de grupos e passagens para as variáveis proliferação e viabilidade. Consideraram-se as diferenças significativas quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde o processo de excisão do TA das três regiões estudadas até o processamento das células, totalizando cinco passagens, não houve nenhum tipo de intercorrência como complicações trans-cirúrgicas ou contaminação das amostras por fungos e/ou bactérias. Os procedimentos para coleta de material mostraram-se rápidos e seguros, sendo que os locais também apresentaram fácil acesso para remoção da gordura. Esses resultados são semelhantes

aos encontrados por Ribeiro et al. (12), que estudaram CTMs derivadas do TA em equinos. Estes autores relatam que não houve necessidade de tranquilização, mas os animais permaneceram em tronco de contenção durante o procedimento para garantir a segurança do pesquisador, e que a anestesia local foi suficiente para impedir qualquer estímulo doloroso. Para os autores, o uso do cloridrato de lidocaína com vasoconstritor foi importante para minimizar o sangramento durante a coleta, evitando contaminação da amostra. No presente estudo, os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória já que o procedimento de coleta foi de maior porte, envolvendo celiotomia e manipulação visceral abdominal.

A quantidade de material coletado foi variável entre os animais, conforme já descrito na tabela 1. Retirou-se em média 2,66 g de omento maior, 4 g de tecido adiposo da região perirrenal e 5,66 g da bolsa adiposa interescapular. Essa variação ocorreu, pois na região escapular existe uma quantidade bem maior de tecido adiposo do que nas outras regiões coletadas. Ribeiro et al. (12) também relataram diferenças nas quantidades de tecido excisadas de cada animal quando trabalharam com equinos, coletando em média 13,44 g de tecido por animal. No presente trabalho, a quantidade coletada de cada região foi suficiente para isolar e cultivar apropriadamente as CTMs.

Heimburg et al. (13) comparam o rendimento de pré-adipócitos excisados ou aspirados de tecido adiposo humano e verificaram que o material lipoaspirado apresenta rendimento maior que o excisado, provando que a sucção não danifica a fração de células do estroma do tecido adiposo. Em nosso estudo, verificamos que a quantidade de CTM obtida a partir da excisão tecidual foi plenamente satisfatória em todos os sítios coletados, destacando o omento maior como local da maior média de rendimento celular.

A metodologia utilizada para o processamento e cultivo das amostras foi considerada simples e muito eficiente. A capacidade proliferativa das CTMs derivadas do tecido adiposo foi mantida no decorrer do tempo experimental em todas as passagens e locais estudados. A partir do método de exclusão por azul de tripan, podem-se observar maior média para o grupo omento quando comparado com os grupos perirrenal e escápula, porém, com significância estatística ( $p < 0,05$ ) apenas entre os grupos omento e escápula ( $p = 0,02344$ ) (Tabela 2, Figuras 3 e 4). Verificou-se que a quantidade de gordura omental foi a menor entre todas as fontes. Pôde-se observar também que houve queda na proliferação entre as passagens 1 e 2, seguida de recuperação nas passagens subsequentes. Outros pesquisadores (5), em seus estudos com MSCs derivadas do tecido adiposo de humanos, também observaram recuperação acentuada na proliferação celular entre a terceira e sexta passagens. Em relação a média de quantidade nossos resultados superam os encontrados por Patricio (14), que utilizou células derivadas do tecido adiposo subcutâneo de cães. Na oportunidade a autora obteve uma média de 146.803 cél/g de tecido, bem inferior a desta pesquisa, que foi de 892.182 cél/g de tecido. Segundo Neupane et al. (15), diferentemente dos resultados encontrados no presente estudo, tem-se mais sucesso no isolamento de CTMs com tecido adiposo subcutâneo, comparado com tecido do omento e de depósitos inguinais.

Tabela 2. Médias de proliferação (Prol.) por grama tecido adiposo e viabilidade (Viab.) (%), com seus respectivos desvios padrão, das CTMs derivadas do tecido adiposo coletadas do omento maior, região perirrenal e bolsa adiposa interescapular em coelhos ( $p < 0,05$ ).

Locais/médias	Médias Prol.	Desvio Padrão	Médias Viab.(%)	Desvio Padrão
Omento	1.423.372 a	1.463.467,2	94,27	0,07
Perirrenal	751.335 ab	504.370,5	92,89	0,11
Escápula	501.840 b	302.523,9	95,28	0,06

\*Letras diferentes em mesma coluna demonstram diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

A proliferação (cél/g de tecido adiposo) variou entre os locais durante as cinco passagens. Nas CTMs coletadas do omento e região perirrenal foi observada maior expansão

na primeira passagem. Já as coletadas da bolsa adiposa interescapular tiveram sua máxima proliferação na quarta passagem (Figura 2). Kern et al. (5) em seus estudos encontraram máxima expansão na oitava passagem. Os dados diferem nos dois experimentos, porém, na presente pesquisa foram realizadas apenas cinco passagens e não nove, como verificado nos trabalhos dos autores citados acima.

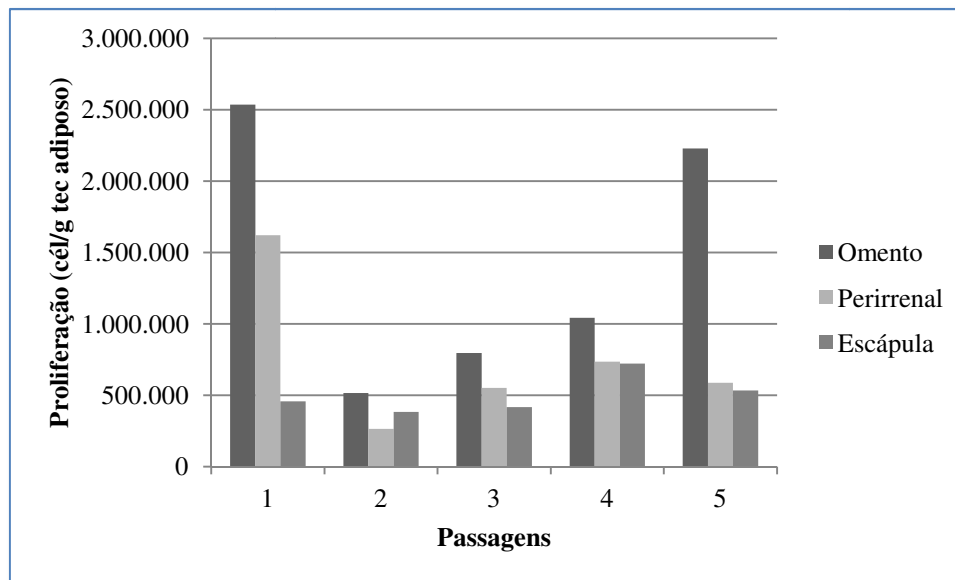


Figura 2. Gráfico demonstrando as médias de proliferação das CTMs (células/g de tecido) dos locais coletados. Observar que as células obtidas de tecido adiposo coletado do omento maior de coelhos Nova Zelândia apresentaram maior proliferação em todas as passagens.

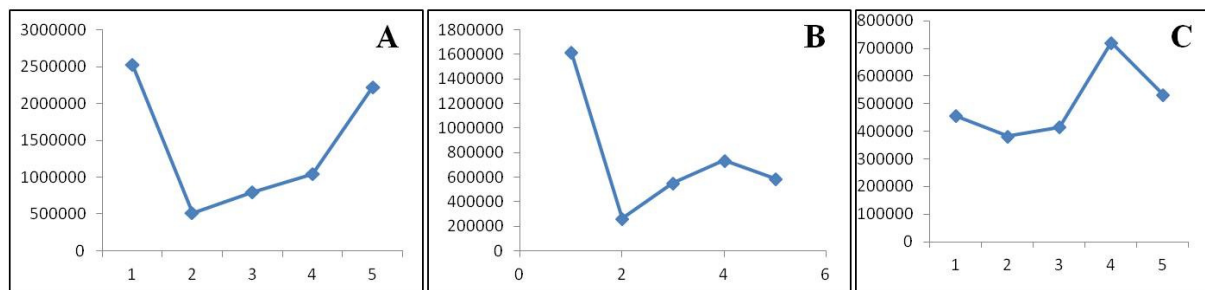


Figura 3. Gráficos lineares demonstrando a média de proliferação das CTMs (células/g de tecido) de cada local coletado. Para as células do omento (A) e gordura perirrenal (B) ocorre uma queda acentuada na segunda passagem e uma recuperação nas demais. Observar que a recuperação do omento é melhor do que a da perirrenal. Nas células da bolsa adiposa interescapular (C) a tendência é linear, ou seja, independente da passagem, o número de células por grama se mantém.

As médias de viabilidade celular entre os tecidos estudados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, embora as células derivadas da bolsa adiposa interescapular tenham se mostrado levemente superiores as do omento maior e região perirrenal, sendo que todas se mantiveram acima dos 92% (Tabela 2). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Heimburg et al. (13), que também obtiveram média de viabilidade alta (94%) nas culturas de pré-adipócitos humanos obtidas de tecido adiposo excisado ou lipoaspirado. Ribeiro et al. (12), após processamento de células derivadas de tecido adiposo da região glútea de equinos obtiveram viabilidade de 96%. Treichel (16) estudando CTMs do tecido adiposo de coelhos Nova Zelândia obteve média de viabilidade de 99,8% nas passagens iniciais, porém, não menor que 92% no restante das passagens. No presente estudo, pode-se observar ligeira queda da viabilidade nas células derivadas da região perirrenal, sendo que

esta na quinta passagem apresentou-se como a menor viabilidade entre todas (81,24%) (Tabela 3). Esse dado encontrado foi semelhante ao encontrado por Maciel (17), estudando células do tecido adiposo de gatos, que chegou a verificar percentual de viabilidade de 73% na quinta passagem, com média de 81,8% entre suas amostras. Esse fato pode ser explicado talvez pelo processo natural de senescência (envelhecimento celular) ocorrido com as CTMs deste local, indicado pela baixa taxa de proliferação e viabilidade da cultura após algumas passagens. Observou-se que algumas células já apresentavam na quarta passagem morfologia indicativa de processo de envelhecimento.

Tabela 3. Viabilidade celular (%) das CTMs derivadas do tecido adiposo de coelhos Nova Zelândia nas cinco passagens realizadas, de acordo com cada local coletado.

Passagens/locais	Omento	Perirrenal	Escápula
P1	99,37% a	99,32% a	97,08% ab
P2	95,73% ab	95,68% ab	98,75% a
P3	98,59% a	97,00% ab	99,45% a
P4	83,67% b	91,23% b	87,66% b
P5	93,99% ab	81,24% b	93,46% ab

A citometria de fluxo revelou que, quando avaliados juntamente os CDs positivos 90 e 105 e o negativo CD45, 62,7% das células mostraram-se positivas para as duas primeiras proteínas de superfície e negativas para a última, conforme esperado quando se fala em CTM; também foi verificada positividade de 60,5% das células para o CD73 (Figura 4). Embora já tenham sido identificados oito marcadores de superfície para identificação de MSC, a International Society for Cellular Therapy concorda que apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, quando não estiverem expressos marcadores hematopoiéticos (CD45, por exemplo), é suficiente para a imunofenotipagem dessas células (3), conforme ocorrido neste estudo. A citometria de fluxo revelou que há reação cruzada entre humanos e coelhos, conforme também verificado no estudo de Carvalho et al. (18), utilizando ADSCs de equinos. Por problemas técnicos no laboratório não foi possível a realização da diferenciação nas três linhagens citadas pela literatura.

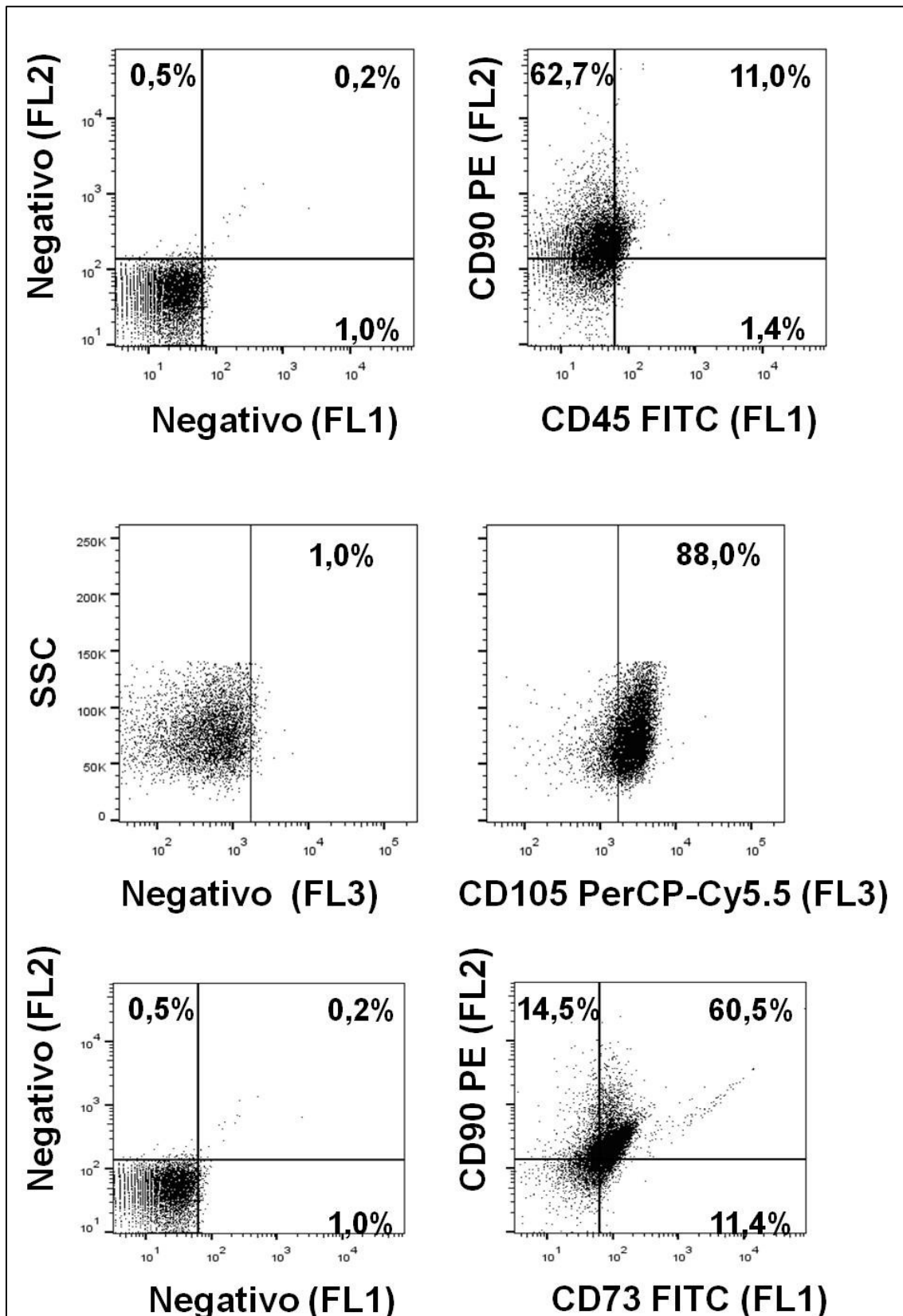


Figura 4. Citometria de fluxo das CTMs derivadas do tecido adiposo de coelhos Nova Zelândia. Observar positividade para os CDs 73, 90 e 105 e negatividade para o CD45.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados neste estudo, concluí-se que existe variação na capacidade proliferativa das CTMs em relação às regiões estudadas, com vantagem estatisticamente significativa da gordura omental sobre a derivada da escápula. A viabilidade das CTMs apresenta variações durante as diferentes passagens.

## COMISSÃO DE ÉTICA

Este projeto foi submetido e aprovado em 10 de setembro de 2012 pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria, sob parecer nº 060/2012.

## REFERÊNCIAS

1. Smedo 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.
2. Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
3. Monteiro BS, Argolo Neto NM, Del Carlo RJ. Células-tronco mesenquimais. *Cienc Rural*. 2010;40(1):238-45.
4. Pinto Filho STL, Treichel TLE, Aramburu Jr JS, Rosa MB, Dalmolin F, Brun MV, et al. Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. *Vet Zoot*. 2013;20:49-59.
5. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-301.
6. Pereira ISO, Pontes P, Eça LP, Ferreira AT, Mazzetti PMV, Silva L, et al. Protocolo piloto de separação e quantificação de células-tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. *Acta ORL*. 2008;26(3):11-6.
7. 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.
8. Frühbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280(6):E827-47.
9. Yarak S, Okamoto OK. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *An Bras Dermatol*. 2010;85(5):647-56.
10. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Exp Cell Res*. 2006; 312(6):727-36.
11. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues. *Arthritis Rheum*. 2005;52(8):2521-9.

12. Ribeiro G, Massoco CO, Lacerda Neto JC. Viabilidade celular da fração mononuclear da medula óssea e fração vascular estromal do tecido adiposo de equinos após o processo de congelamento e descongelamento. *Pesqui Vet Bras*. 2012;32 Supl 1:118-24.
13. Heimburg DV, Hemmricha K, Haydarlioglua S, Staiger H, Pallua N. Comparison of Viable Cell Yield from Excised versus Aspirated Adipose Tissue. *Cells Tissues Organs*. 2004; 178(2):87-92.
14. Patricio LFL. Isolamento, cultivo e diferenciação de células-tronco mesenquimais de cães [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.
15. Neupane M, Chang CC, Kiupel M, Gurkan VY. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cell. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(6):1007-15.
16. Treichel TLE. Contribuições para o uso de células estromais mesenquimais no reparo de feridas cutâneas e no transplante de pele em coelhos [tese]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2014.
17. 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.
18. Carvalho AM, Yamada ALM, Golim MA, Álvarez LEC, Jorge LL, Conceição ML, et al. Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2013;65(4):939-45.

**Recebido em: 27/08/2014**

**Aceito em: 07/10/2015**

## OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*NEOSPORA CANINUM* E ESTUDO DOS FATORES DE RISCO EM CÃES DE CUIABÁ E VARZÉA GRANDE-MT, ATENDIDOS EM HOSPITAL VETERINÁRIO

Michelle Igarashi<sup>1</sup>  
Luciana Aparecida dos Santos<sup>1</sup>  
Alexandre Mendes Amude<sup>1</sup>  
Livia Saab Muraro<sup>1</sup>  
Daniel Moura Aguiar<sup>2</sup>  
Andréia Lima Tome Melo<sup>2</sup>  
Thábata dos Anjos Pacheco<sup>2</sup>  
Risía Lopes Negreiros<sup>3</sup>  
Rafael Rodrigues da Silva<sup>1</sup>

### RESUMO

*Neospora caninum* é um protozoário intracelular obrigatório de distribuição mundial, responsável por doenças neuromusculares em cães. Os cães são os hospedeiros definitivos do *N. caninum* e são fundamentais na transmissão do parasito aos outros animais. Nos cães a neosporose é responsável por doenças neuromusculares, cardíacas, pulmonares e dérmicas. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães atendidos na rotina hospitalar do Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá, assim como associar os principais fatores de risco para a infecção. Foram analisadas 199 amostras de soro de cães, por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com ponto de corte de 1:50. Dessas amostras 82,5% foram provenientes de Cuiabá, 15% do município de Varzea Grande e 2,3% de localidades vizinhas. Foram encontrados anticorpos anti-*N. caninum* em 31 amostras (15,6%) com títulos que variaram entre 50 e 1600. Das variáveis analisadas, somente tipo de alimentação (caseira ou mista) apresentou associação com a presença de anticorpos ( $p < 0,05$ ). Os resultados indicam que os cães das localidades estudadas estão expostos ao *N. caninum* e que umas das medidas de controle da infecção deve incluir a uma alimentação restrita com ração comercial.

**Palavras-chave:** neosporose canina, imunofluorescência, alimentação.

### OCURENCY OF ANTIBODIES ANTI-*Neospora caninum* AND STUDY OF RISK FACTORS IN DOGS from CUIABÁ AND VÁRZEA GRANDE – MT, TREATED IN THE VETERINARY HOSPITAL

### ABSTRACT

*Neospora caninum* is an obligate intracellular protozoan of worldwide distribution, it is responsible for neuromuscular diseases in domestic dogs. Dogs are the definitive host of *N. caninum* and are fundamental in the parasite transmission to other animals. Neosporosis in dogs is responsible for the neuromuscular, heart, lung and dermal diseases. The purpose of this study was to determine the prevalence of anti-*N. caninum* antibody in dogs treated at the hospital routine, in the Veterinary Hospital of the University of Cuiabá, as well as associate its major risk factors to infection. 199 serum samples from dogs were analyzed by indirect

<sup>1</sup> Departamento Doenças Parasitárias de Animais, Medicina Veterinária Preventiva, Universidade de Cuiabá. Contato principal para correspondência.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Mato Grosso

<sup>3</sup> INDEA



immunofluorescence assay (IFA) with cut off of 1:50. 82.5 % of these samples were from Cuiabá, 15 % from Várzea Grande and 2.3 % from neighboring towns. Anti – *N. caninum* antibodies were found in 31 samples (15.6%) with titles ranging from 50 to 1600. From the variables only type of food (homemade or mixed) presented association to the presence of antibodies ( $p < 0.05$ ). The results confirm that the dogs from these cities are exposed to *N. caninum* and that some of the control measures of the infection in the studied area would include a restricted feed of pet food.

**Keywords:** canine neosporosis, immunofluorescence, feed.

## OCURRENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Neospora caninum* Y ESTUDIO DE LOS FACTORES DE RIESGO EN PERROS EN CUIABÁ Y VARZEA GRANDE-MT, SERVIDO EN HOSPITAL VETERINARIO

### RESUMEN

*Neospora caninum* es un protozoario intracelular obligatorio de distribución en todo el mundo, responsable de enfermedades neuromusculares en los perros domésticos. Los perros son considerados el huésped definitivo del *N. caninum* y son fundamentales en la transmisión de otros animales. La neosporosis en perros es responsable de las enfermedades neuromusculares, corazón, pulmón y dérmicos. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de anti-*N. caninum* en perros tratados en la rutina del hospital, el Hospital Veterinario de la Universidad de Cuiabá, e involucrar a los principales factores de riesgo para la infección. 199 muestras de suero de los perros se analizaron mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con punto de corte 1:50. El 82.5% de estas muestras eran de Cuiabá, el 15% de Varzea Grande, 2.3% de localidades vecinas. Se encontraron anticuerpos anti -*N. caninum* en 31 muestras (15.6%) con títulos que van de 50 a 1600. Sólo la variable tipo alimento (casero o mixto) se asoció con la presencia de anticuerpos ( $p < 0,05$ ). Los resultados confirman que los perros están expuestos al *N. caninum* y que algunas de las medidas de control para la prevención de la infección incluye una ración de alimento restringido.

**Palabras clave:** neosporosis canina, inmunofluorescencia, pienso.

### INTRODUÇÃO

*Neospora caninum* é um parasito coccídeo, obrigatoriamente intracelular, responsável pela neosporose, que tem emergido como uma grave doença em bovinos e cães de todos os continentes (1). Cães (*Canis lupus familiaris*) (2), coiotes (*Canis latrans*) (3), dingo (*Canis lupus dingo*) (4) e lobos cinzentos (*Canis lupus*) (5) são considerados os hospedeiros definitivos do *N. caninum* e importantes na transmissão do protozoário a outros animais. O agente é considerado umas das principais causas de abortos entre bovinos (1), e em cães a neosporose pode ocasionar alterações neuromusculares, cardíacas, pulmonares e lesões cutâneas (6,7).

No Brasil, a prevalência de anticorpos contra *N. caninum* pode variar de 4 a 54,2% em cães de diferentes regiões do país (8,9). A soroprevalência em cães revela índices que variam com o habitat, a idade, o convívio dos cães com bovinos, a dieta e a técnica sorológica utilizada, entre outros fatores (10). Segundo Sicupira et al. (11), Jesus et al. (12), Ferroglio et al. (13) e Wouda et al. (14) alguns fatores de risco como a ingestão de prováveis hospedeiros intermediários pelos cães (roedores, pássaros e outros mamíferos), o consumo de alimentos caseiros crus ou mal cozidos, a ingestão direta de oocistos e o contato de cães e bovinos em

áreas rurais que permitem a ingestão de membranas fetais e fluidos de animais infectados, podem contribuir para a transmissão horizontal do parasito aos cães.

Na região sudoeste do Estado de Mato Grosso, soroprevalência de 67,6% (37/25) de *N. caninum* foi relatada (15) em cães rurais, evidenciando a presença dos cães na epidemiologia dos bovinos e outras espécies animais da região.

O objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães da área urbana de Cuiabá e Várzea Grande, Mato Grosso e identificar alguns fatores de risco (sexo, idade, procedência, raça) associados à presença de *N. caninum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Entre o período de janeiro de 2010 a julho de 2013 foram obtidas 199 amostras de soro de cães, de ambos os sexos e sem raça definida, atendidos na rotina da clínica médica de pequenos animais do Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá, UNIC. A população de cães hospitalares foi proveniente do município de Cuiabá e Várzea Grande. O programa Epi-Info 6.04 foi usado para o cálculo amostral com prevalência esperada de 50%, precisão mínima de 10% e intervalo de confiança (IC) de 95% de acordo com Thrusfield (16).

Durante a coleta de sangue, cada cão foi identificado e os proprietários foram convidados a responderem um questionário epidemiológico com informações sobre o animal e o ambiente. Desse questionário foram retiradas as variáveis: origem dos cães (urbanos, rurais ou periurbanos), raça, idade, sexo, tipo de alimentação (comercial, caseira+comercial, caseira), contato com bovinos ou outros hospedeiros intermediários (roedores, pássaros), hábitos de caça e observação de sinais neurológicos.

A pesquisa de anticorpos contra *N. caninum* foi realizada por meio da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando como antígeno a cepa Nc-BAHIA de *N. caninum* segundo a técnica descrita por Thrusfield (16), com ponto de corte de 50. Em todas as lâminas foram adicionados como controle soros caninos positivos e negativos. As reações foram consideradas positivas, quando os taquizoítos apresentavam fluorescência periférica total. Reações com fluorescência parcial ou apical foram interpretadas como negativas. As amostras consideradas positivas passaram por sucessivas diluições na razão dois para obtenção do título.

As análises de associação foram realizadas pelos testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher quando necessário ( $p < 0,05$ ) para associar os resultados da sorologia com fatores de risco ou variáveis analisadas.

O procedimento de coleta de amostras foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá (Registro nº 029 CEP/UNIC - protocolo nº 2010-020)

## RESULTADOS

Os resultados mostram que *N. caninum* está presente em 15,6% (31/199) dos cães avaliados, com título de 50 em 4% (8/31) dos animais, 100 em 2% (4/31), 200 em 6,5% (13/31), 400 em 2,5% (5/31) e somente 1 dos 31 (0,5% cães apresentou título de 1600.

Os resultados de frequências e a análise de associação das diferentes variáveis com a sorologia para *N. caninum* estão apresentados na Tabela 1.

A análise das variáveis acesso à rua, hábitos de caça, ingestão de carne crua, ingestão de vísceras, origem, contato com outros cães, bovinos e roedores não apresentaram associação com a presença de anticorpos contra *N. caninum* ( $p > 0,05$ ). Apenas a variável tipo de alimentação mostrou-se significativa ( $p = 0,04$ ), indicando que em cães que se alimentam exclusivamente de comida caseira a soroprevalência foi maior.

Tabela 1. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães do município de Cuiabá e Várzea Grande-MT, e análise de associação com as variáveis estudadas.

Fatores	Categoria	Cães positivos n (%)	Cães negativos n (%)	OR (95% IC)	P
Acesso a rua	Sim	15 (17)	73 (82)	1.22 (0.53-2.81)	0.61
	Não	16 (14)	95 (85)		
Hábitos de caça	Sim	5 (16.6)	25 (83.3)	1.10 (0.33-3.40)	0.85
	Não	26 (17.1)	143 (84.6)		
Ingestão de carne crua	Sim	5 (11.3)	39 (88.6)	0.66 (0.21-1.98)	0.42
	Não	26 (16.7)	129 (83.8)		
Ingestão de vísceras	Sim	4 (13.8)	25 (86.2)	0.85 (0.23-2.85)	0.77
	Não	27 (15.9)	143 (84.1)		
Alimentação caseira		3 (37.5)	5 (62.5)	1.00	0.04
Caseira+ração		14 (18.4)	62 (81.6)	0.38	
Ração		14 (12.2)	101 (87.8)	0.23	
Origem não informado		1 (50.0)	1 (50.0)	1.00	0.10
Peri-urbano		3 (33.3)	6 (66.7)	0.50	
Rural		2 (18.9)	9 (81.8)	0.22	
Urbano		25 (14.1)	152 (85.9)	0.16	
Contato com outros cães	Sim	31 (16.0)	162 (84.0)	Não definido	0.28
	Não	0 (0.00)	6 (100)		
Contato com bovinos	Sim	2 (20.0)	8 (80.0)	1.38 (0.0*- 7.58*)	0.69
	Não	29 (15.3)	160 (84.7)		
Contato com roedores	Sim	5 (22.7)	17 (77.3)	1.71 (0.50-5.52)	0.32
	Não	26	151		

## DISCUSSÃO

Devido às manifestações clínicas severas da neosporose, principalmente em filhotes congenitamente infectados com paralisia ascendente e hiperextensão rígida (6,17,18) e mesmo diante de casos clínicos isolados, torna-se necessário o estudo relacionado à neosporose canina na região de Cuiabá e Várzea Grande, a qual apresenta poucos dados sobre a doença.

No Brasil, a prevalência de anticorpos contra *N. caninum* varia entre 4,3 a 58,9% em cães de diversas regiões do país (19). Nesse estudo 15,6% dos cães apresentaram anticorpos anti *N. caninum*. Benetti et al. (15), ao analisarem 37 amostras de cães encontraram 67,6% de amostras com anticorpos anti *N. caninum* na região sudoeste do Estado de Mato Grosso porém, todos os cães eram de propriedades rurais de bovinos leiteiros. Melo et al. (20) em 406 cães do município de Cuiabá-MT, observaram 6,6% de amostras soropositivas.

Nesse estudo, cães alimentados somente com comida caseira podem apresentar maior risco (OR=1.00) de adquirir o protozoário do que aqueles que ingerem alimentos mistos (caseiro+ração) ou aqueles animais que ingerem somente ração comercial, devido a maior exposição desses animais a carne ou vísceras contaminadas com cistos teciduais. Bresciani et al. (21) e Teixeira et al. (22) observaram também a alimentação caseira como um fator de risco que contribui para a soropositividade dos animais.

A pesquisa demonstrou que os 31 animais soropositivos apresentavam contato com outros cães e 15 possuíam acesso as ruas, dois fatores de risco que poderiam aumentar as chances de infecção ao parasito, porém que não foram estatisticamente significativos. Bandini et al. (23) relataram que a infecção de cães por *N. caninum* ocorre principalmente pela ingestão de cistos teciduais e não pela ingestão de oocistos eliminados nas fezes, confirmando a importância dos resultados da presente pesquisa no risco da ingestão de carne crua ou mal passada na dieta de cães.

## CONCLUSÃO

Por meio desse estudo foi verificado que a variável alimentação representa um fator de risco que favorece a infecção com uma maior ocorrência de anticorpos para o protozoário *N. caninum* em cães urbanos provenientes dos municípios de Cuiabá e Várzea Grande, MT. Outros estudos sobre o parasito no Estado do Mato Grosso são necessários para melhor compreensão da infecção.

## AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Mato Grosso (FAPEMAT).

## REFERÊNCIAS

1. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev. 2007;20:323-67.
2. Mcallister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, Mcguire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 1998;28:1473-8.
3. Gondim LFP, Mcallister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 2004;34:159-61.
4. King JS, Slapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA. Australian dingos are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 2010;40:945-50.
5. Dubey JP, Jenkins MC, Ferreira LR, Choudharya S, Verma SK, Kwok OCH, et al. Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (*Canis lupus*). Vet Parasitol. 2014;201:150-3.
6. Dubey JP. Neosporosis in cattle. J Parasitol. 2003;89:42-56.
7. Mcinnes LM, Irwin P, Palmer DG, Ryan UM. In vitro isolation and characterization of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. Vet Parasitol. 2006;137:355-63.
8. Romanelli PR, Freire RL, Vidotto O, Marana ERM, Ogawa L, De Paula VSO, et al. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. Res Vet Sci. 2007;82:202-7.
9. Figueredo LA, Dantas-Torres F, Faria EB, Gondim LF, Simões-Matos L, Bramdão-Filho SP, et al. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from Pernambuco, Northeast Brazil. Vet Parasitol. 2008;157:9-13.
10. Cañon-Franco WA, Bergamaschi DP, Labruna MB, Camargo LMA, Souza SLP, Silva JCR, et al. Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. Vet Parasitol. 2003;115:71-4.
11. Sicupira PML, Magalhães VCS, Galvão GS, Pereira MJS, Gondim LFP, Munhoz AD. Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. Vet Parasitol. 2012;185:305-8.

12. Jesus EEVD, Santos POM, Barbosa MVF, Pinheiro AM, Gondim LFP, Guimarães JE, et al. Frequência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em cães nos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, Estado da Bahia-Brasil. Braz J Vet Res Anim Sci. 2006;43:5-10.
13. Ferroglio E, Pasino M, Ronco F, Bena A, Trisciuglio A. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in urban and rural dogs in north-west Italy. Zoonoses Public Health. 2007;54:135-9.
14. Wouda W, Dijkstra T, Kramer AMH, Van Maanen C, Brinkhof JMA. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. Int J Parasitol. 1999;29:1677-82.
15. Benetti AH, Schein FB, Santos TR, Toniollo GH, Costa AJ, Mineo JR, et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Gross. Rev Bras Parasitol Vet. 1995;18:29-33.
16. Thrusfield M. Veterinary Epidemiology. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd; 1995.
17. Ruehlmann D, Poddel M, Oglesbee M, Dubey JP. Canine neosporosis: a case report and literature review. J Am Anim Hosp Assoc. 1995;31:174-83.
18. Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. Confirmation that dogs are definitive host for *Neospora caninum*. Vet Parasitol. 1999;82:327-33.
19. Gennari SM. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. Rev Bras Parasitol Vet. 2004;13:23-7.
20. Melo ALT, Silva GCP, Aguiar DM. Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da cidade de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. Semina Cienc Agrar. 2012;33:1507-14.
21. Bresciani KDS, Costa AJ, Nunes CM, Serrano ACM, Moura AB, Stobbe NS, et al. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* e estudos de fatores de risco em cães de Araçatuba-SP. ARS Vet. 2007;23:40-6.
22. Teixeira MA, Araujo FAP, Silva RG, Stobbe NS. Soroepidemiologia de *Neospora caninum* em cães de área urbana no município de Porto Alegre-RS. Rev Bras Cienc Vet. 2012;19:154-7.
23. Bandini LA, Alves Neto AF, Pena HFJ, Cavalcante GT, Schares G, Nishi, SM, et al. Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. Vet parasitol. 2011;176:151-6.

**Recebido em: 25/04/2014**

**Aceito em: 14/10/2015**

**ACCURACY OF A MULTIPLEX PCR PROTOCOL FOR *Staphylococcus aureus*,  
*Streptococcus agalactiae* AND *Escherichia coli* DETECTION IN BULK TANKS**

Marcella Zampoli Troncarelli<sup>1</sup>  
Helio Langoni<sup>2</sup>  
Virginia Bodelão Richini-Pereira<sup>3</sup>  
Pâmela M. Marson<sup>1</sup>  
Rodrigo Costa Da Silva<sup>1</sup>

**ABSTRACT**

The objective of the present study was to evaluate the accuracy of a multiplex PCR (mPCR) protocol for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* detection in bovine milk samples collected from bulk tanks. Twenty dairy farms in mid-west of São Paulo State, Brazil were enrolled in the study. Milk samples collected from each bulk tank were evaluated by mPCR and microbiological culture (gold standard test). *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* were isolated by culture in 30%, 10% and 40% respectively, and detected by mPCR in 0%, 10% and 35% bulk tank milk samples respectively. mPCR has presented 93.2% specificity and 37.5% sensitivity values, with 78.3% accuracy. This mPCR protocol was efficient for *S. agalactiae* and *E. coli* detection in the evaluated bulk tank milk samples, but failed to detect *S. aureus*. Despite the high specificity values obtained by mPCR, the sensitivity levels were low, indicating that this molecular method should only be recommended as a complementary diagnosis test for milk quality monitoring in bulk tanks.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, microorganisms, molecular diagnosis, dairy, bulk tank, milk.

**ACURÁCIA DE PROTOCOLO DE MULTIPLEX PCR PARA DETECÇÃO DE  
*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* E *Escherichia coli* EM TANQUES DE  
EXPANSÃO****RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar a acurácia de um protocolo de multiplex PCR (mPCR) para detecção de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão. Vinte propriedades leiteiras localizadas no centro-oeste do estado de São Paulo foram envolvidas no estudo. As amostras de leite colhidas de cada tanque de expansão foram examinadas por mPCR e por cultivo microbiológico (padrão ouro). *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* foram isolados em 30%, 10% e 40% das amostras avaliadas, respectivamente, e detectados por mPCR em 0%, 10% e 35% amostras de leite, respectivamente. O protocolo de mPCR utilizado apresentou 93,2% de especificidade e 37,5% de sensibilidade, com 78,3% de acurácia. O mPCR foi eficiente para a detecção de *S. agalactiae* e de *E. coli* nas amostras de leite de tanques de expansão avaliadas, porém não possibilitou a detecção de *S. aureus*. Apesar da alta especificidade, a sensibilidade da mPCR foi baixa, indicando que esta técnica molecular poderia ser recomendada unicamente como teste diagnóstico complementar para o monitoramento da qualidade do leite em tanques de expansão.

<sup>1</sup> Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Medicina Veterinária Preventiva. UNESP Botucatu-SP, Contato principal para correspondência.

<sup>2</sup> Professor Titular do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ UNESP Botucatu-SP

<sup>3</sup> Pesquisadora Científica - Instituto Adolfo Lutz, Bauru-SP

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, microorganismos, diagnóstico molecular, propriedade leiteira, tanque de expansão, leite.

## ACURACIA DE UN PROTOCOLO DE MULTIPLEX PCR PARA LA DETECCION DE *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* Y *Escherichia coli* EN TANQUES ENFRIADORES

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la acuracia de un protocolo de multiplex PCR (mPCR) para la detección de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* en muestras de leche bovina obtenidas de tanques enfriadores. Veinte haciendas lecheras localizadas en el centro-oeste de la provincia de San Pablo fueron involucradas en el estudio. Las muestras de leche obtenidas de cada tanque enfriador fueron examinadas por mPCR y por cultivo microbiológico (gold standard). *S. aureus*, *S. agalactiae* y *E. coli* fueron aislados en 30%, 10% y 40% de las muestras evaluadas, respectivamente, y detectados por mPCR en 0%, 10% y 35% muestras de leche, respectivamente. El protocolo de mPCR utilizado presentó 93,2% de especificidad y 37,5% de sensibilidad, con 78,3% de acuracia. El mPCR fue eficiente para la detección de *S. agalactiae* y de *E. coli* en las muestras de leche de tanques enfriadores evaluadas, todavía no permitió la detección de *S. aureus*. Mientras los elevados índices de especificidad, los valores de sensibilidad de la mPCR fueron bajos, indicando que esta técnica molecular podría ser recomendada únicamente como test diagnóstico complementar para el monitoreo de la calidad de la leche en tanques enfriadores.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, microorganismos, diagnóstico molecular, hacienda lechera, tanque enfriador, leche.

### INTRODUCTION

The Normative Instructions n.51 (1) and n.62 (2) published by Brazilian Ministry of Agriculture represent technical regulatory determinations for milk production, identity, quality, sampling and transport, in order to improve milk quality. These legal requirements have been started in July 2005 and have determined an intensive demand for fast, cost feasible and highly accurate diagnosis methods, in order to process a high number of milk samples, in milk quality control programs (3). Despite these regulations were recently approved in Brazil, the concept of mastitis control, milk quality and food safety is very well structured in other countries, especially in North America and Europe. In these regions, scientific studies using molecular techniques for pathogens detection in milk products and milk samples have been developed since 1990's (4). Molecular biology has significantly contributed for an accurate detection of microorganisms in milk samples, individually collected from cows' quarters, or composed obtained from bulk tanks.

Some inhibitors factors that normally difficult the microorganisms detection by routine microbiological culture methods like antimicrobial residues, low number of microorganisms in samples, and contamination with environmental pathogens, have no interference when using molecular techniques. The direct detection of pathogen DNA and/or specific genes usually determines high sensitivity and specificity values (5).

First molecular trials were based on the detection of one target DNA (one genus or specie) by simplex PCR protocols using one pair of primers. In the past 10 years, the researchers have been adjusting the DNA extraction and amplification protocols, in order to obtain optimized conditions to detect more than one target DNA, as duplex PCR (two target DNAs) and multiplex PCR (mPCR), for the identification of more than two target DNAs (6).

Recent studies using different mPCR protocols reported results in individual or composed milk samples, also contributing with epidemiological evaluations (7). However, there are some intrinsic characteristics of milk composition and also some microorganisms' particularities that directly affect mPCR's accuracy (8).

The aim of the present study was to use an mPCR protocol for *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* detection in milk samples collected from bulk tanks in Sao Paulo, Brazil, and to evaluate the accuracy of this method in order to verify its applicability in milk quality control programs. The chosen of *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* as target microorganisms is due their importance as main mastitis pathogens in Brazil and also because of their pathogenic potential for public health.

## MATERIAL AND METHODS

### Dairy farms selection

Twenty dairy farms sited in mid-west cities of Sao Paulo State, Brazil, were enrolled randomly, as follows: four dairies in Botucatu; three dairy farms in Itatinga; two dairies in Nova Odessa and other two farms in Sao Pedro; and one dairy farm in each of the following cities: Areiópolis, Pardinho, Lençóis Paulista, Porto Feliz, Lins, Agudos, Araras, Santa Rita do Passa Quatro and Conchas. The selection criteria used for farm selection were: farms with milking machine systems and individual milk bulk tanks (obligatory items for inclusion in the study). Dairies had 19 to 970 cows in lactation (median 92) with 18.3 L milk daily production (median).

### Samples

Milk samples from bulk tanks were collected until 24 hours after milking and after 5 minutes homogenization. A total of 250 mL of milk were collected from each bulk tank. Samples were kept in sterile glass recipients and transported under refrigeration (4-8°C) to the laboratory for analysis.

### Microbiological culture

For identification of microorganisms strains, all milk samples collected from bulk tanks were diluted to  $10^{-1}$  and  $10^{-2}$  and one mL of each diluted sample was inoculated into blood agar (5%) and MacConkey agar and incubated at 37°C during 72 hours. The bacterial strains were identified according to Quinn et al. (9).

### Standard bacterial strains

*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 11229) standard strains from Culture Collection of Adolfo Lutz Institute, Sao Paulo, and *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813) standard strain from National Institute for Health Control Quality (INCQS), Rio de Janeiro, were used as positive controls in tests.

### *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* DNA detection

**DNA extraction.** The DNA extraction from Milk samples and from bacterial standard strains was carried out using the Milk Bacterial DNA Isolation Kit (NorgenBiotek Corporation, Ontario, Canada), according to supplier's recommendation.

**Primers.** For *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* detection, primers SAU1 and SAU2 (for *S. aureus*), SAGA1 and SAGA2, SIP3(F) and SIP4(R) (for *S. agalactiae*), Ecoli1 and Ecoli2 (for *E. coli*) were used (10). These primers amplify specie-specific DNA regions that codify the 16S and 23rRNA regions of these microorganisms.



**mPCR.** Each mPCR reaction was performed using 17.5µL milli-Q water; 2.5µL buffer (10mM TrisHCl pH 8.0, 50mM KCl); 0.75µL of MgCl<sub>2</sub> (1.5mM); 0.5µL of dNTP (0.2mM); 2.0µL of each primer (10pM); 0.5µL (0.2 U) of *Taq Platinum* DNA polymerase (Invitrogen, USA), and 3µL of genomic DNA (10ng). Thermocycler conditions were: 96°C for 5 min; 30 cycles of 96°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min, and a final extension of 72°C for 8 min. Positive and negative controls were the ATCCs strains and milli-Q water, respectively (10).

**Visualization of amplified products.** The amplified material was visualized by electrophoresis in agarose gel (1.5%) added with 1.0µL/mL of SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen - USA). Electrophoresis was carried out in horizontal cube containing TBE 1X (89 nM Tris-HCl, 89mM boric acid and 20mM EDTA) solution at 65V. mPCR products were visualized in an image analyser (GelDoc-IT™ Imagin System - UVP, USA) by using VisonWorks® LS. It were used 8µL of amplified DNA added to 2µL of stained buffer. 4µL of 100bp ladder was used as marked (Invitrogen, USA).

The expected mPCR products were: *S. agalactiae*: 293 and 590 bp; *E. coli*: 660 bp and *S. aureus*: 1.300 bp (10), as presented in Figure 1.

**Analytical sensitivity and specificity tests.** The concentration of DNA extracted from ATCCs was measured by NanoVue (GE Healthcare®, USA). These samples were diluted at 1.000pg/µL, 100pg/µL, 10pg/µL, 1 pg/µL, 0.1pg/µL and 0.01pg/µL with milli-Q water and after were processed by mPCR. The results were analyzed by electrophoresis.

For primers specificity test it were used standard strains (ATCCs) of *Streptococcus intermedius*, *S. epidermidis*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* and *Pseudomonas aeruginosa*, from INCQS, Rio de Janeiro, Brazil.

**mPCR reproducibility test.** Five samples randomly selected were processed by mPCR during five consecutive days in order to evaluate the reproducibility of test.

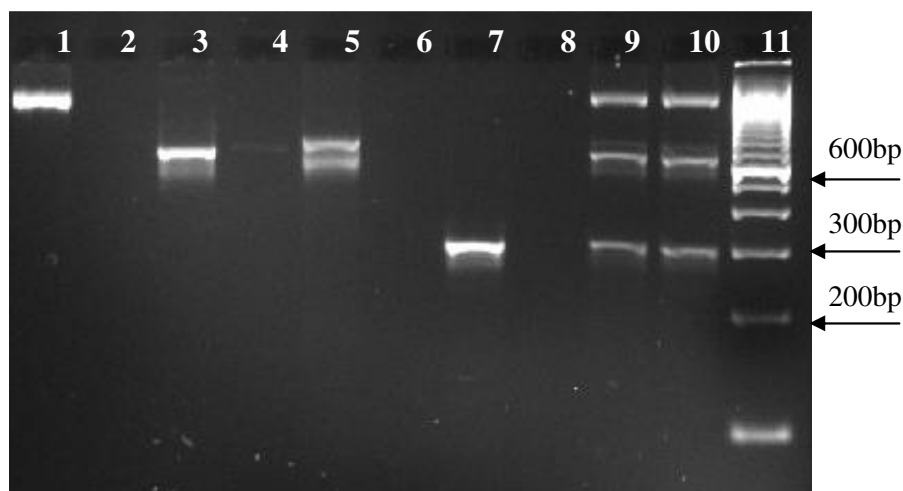


Figure 1. mPCR products obtained from the ATCC strains. 1: *S. aureus* (1.300bp); 3: *E. coli* (660bp); 5: *E. coli* and *S. agalactiae* (590bp); 7: *S. agalactiae* (293bp); 2, 4, 6 and 8: negative controls; 9 and 10: *S. aureus*, *E. coli* and *S. agalactiae*; 11: 100bp DNA ladder (Invitrogen).

### Statistical analysis

*S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* total isolates and percentage frequencies were evaluated according to microbiological culture and mPCR results. mPCR's accuracy, sensibility and specificity evaluation, considering the microbiological culture as gold standard were calculated using Mackinnon spreadsheet (11). All tests were analyzed using a significancy level of 5%.

### Ethical Comitee Approval

The present study was approved by Ethical Comitee for Animal Experimentation of FMVZ-Unesp/Botucatu-SP - Brazil, by Process n° 133/2008-CEEA.

## RESULTS AND DISCUSSION

Frequencies of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* and other bacterial strains isolated from bulk tank milk samples are presented on Table 1.

Non-haemolytical streptococci and staphylococci, common pathogens involved in contagious mastitis cases in dairy cows, were also frequently isolated in the evaluated samples, reinforcing the importance of these bacterial pathogens on final milk quality losses.

Table 1. Frequency of bacterial isolates from bulk tanks milk samples (n=20) from dairy farms of Sao Paulo State, Brazil.

Microorganism	Total Frequency (n)	Percentage Frequency (%)
General microorganisms†	16	28.5
<i>Streptococcus</i> sp.	12	21.4
<i>Staphylococcus</i> sp.	9	16.0
<b><i>E. coli</i></b>	<b>8</b>	<b>14.2</b>
<b><i>S. aureus</i></b>	<b>6</b>	<b>10.7</b>
<b><i>S. agalactiae</i></b>	<b>2</b>	<b>3.5</b>
<i>Candida</i> sp.	2	3.5
<i>Corynebacterium</i> sp.	1	1.7
<b>TOTAL</b>	<b>56</b>	<b>100</b>

†Non-target microorganisms, like some enterobacterial species (*Klebsiella* sp.; *Enterobacter* sp.), *Pseudomonas* sp., etc.

Results regarding the target microorganisms detection by culture and by mPCR are shown in Table 2. Accuracy levels of mPCR compared to microbiological culture are presented on Table 3.

The detection levels of *S. agalactiae* and *E. coli* presented by mPCR were very similar to the results obtained by culture. mPCR showed high specificity (88%) and accuracy (80%) values for *S. agalactiae* detection. The same occurred for *E. coli* -mPCR which had 75% sensitivity; 91.7% specificity and 85% accuracy, with good analytical agreement with microbiological culture. These results were similar to the obtained by Moussa et al. (12), which used an mPCR protocol for shiga toxigenic *E. coli* (STEC) detection and characterization in milk and fecal samples from a dairy herd in Saudi Arabia. The serogroup-specific mPCR detected *E. coli* DNA in all positive samples by microbiological culture. Moreover, four strains (7.98%) O157:H7 and three strains (5.36%) O111 of fecal samples collected from diarrheic animals, as two samples (8.33%) O111 from asymptomatic animals those were negative by microbiological culture, were positive by mPCR. Similarly, a negative sample by culture was positive by mPCR, demonstrating a good sensitivity of the molecular technique for *E. coli* detection.

Table 2. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* frequency in bulk tank milk samples (n=20) from dairy farms, evaluated by microbiological culture and mPCR. Botucatu, Sao Paulo State, Brazil.

Microorganism	Microbiological culture		mPCR	
	Positive	Frequency (%)	Positive	Frequency (%)
<i>S. aureus</i>	6/20	30	0	0
<i>S. agalactiae</i>	2/20	10	2/20	10
<i>E. coli</i>	8/20	40	7/20	35

Table 3. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, accuracy, Kappa coefficient and *p* value obtained using a multiplex PCR protocol for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* detection in 20 bulk tank milk samples compared to microbiological culture. Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

Test (cp/pp/tp) <sup>(1)</sup>	Sens <sup>(2)</sup> (%)	Spec <sup>(3)</sup> (%)	Ppv <sup>(4)</sup> (%)	Npv <sup>(5)</sup> (%)	Ac <sup>(6)</sup> (%)	Kappa <sup>(7)</sup> (%)	<i>p</i> <sup>(8)</sup> (%)
mPCR (16/9/60)	37.5	93.2	66.7	80.4	78.3	0.3564	0.0016

(1) cp: number of positive results by culture; pp: number of positive results by mPCR; tp: total of exams; (2) Sensitivity estimative (% of true positives); (3) Specificity estimative (% of true negatives); (4) Predictive positive value; (5) Predictive negative value; (6) Accuracy value; (7) Kappa coefficient; (8) *p* value (obs.: *p* MacNemar = 0,0923)

Prevalence level: 26.7%

The absence of positive results for *S. aureus* in milk samples by mPCR reinforces the scientific experience that the sensitivity and specificity values of molecular methods for bacteria detection in milk are closely related to the microorganism characteristics. Cellular membrane complexity, for example, may difficults the lysis process during DNA extraction (13) and consequently the accuracy level of primers. A PCR protocol using Sa442- 1 and Sa442-2 primers for *S. aureus* detection in 100 milk samples obtained from bulk tanks of 50 dairy farms in Santa Catarina State (Brazil) had demonstrated 53.8% and 36.5% sensitivity and specificity values for *S. aureus* detection (8). These accuracy levels of the molecular technique were considered very low, when compared to the obtained by culture in Baird-Parker agar, that demonstrated 42% positive samples.

Better accuracy results for *S. aureus* detection from milk by molecular techniques was reported when lysostaphin – a peptidase produced by *Streptococcus simulans* that brokes the cellular membrane of *S. aureus* – is used in DNA extraction protocols (14). This enzyme provides a more specific DNA exposure, resulting in a better detection of the pathogen by PCR (15). In the present study, a commercial kit for DNA extraction was used and despite be indicated for bacterial genomic material isolation from milk samples, this kit does not contains lysostaphin in its composition. This fact may have interfered in the final *S. aureus* DNA amount after extraction process.

Previous studies have demonstrated that pre-incubation, centrifugation and freezing milk samples before DNA extraction may contribute for better sensitivity results in molecular diagnosis. In the first case, *S. aureus* multiplication is improved, and this increases the number of cells. In the second case, *S. aureus* concentration is increased on samples, because of the bacterial pellet, and in the third situation, *S. aureus* DNA exposure increases after defrosting process (16).

Molecular detection of *S. aureus* in milk samples was described to be more accurate when PCR simplex is used. Ymagishi et al. (17) evaluated 106 milk samples collected from quarters and from bulk tank in a dairy farm in Japan. *S. aureus* was identified in nine samples by PCR and only in three samples by microbiological culture, with a detection level of 1

CFU/mL. Faccioli (18) examined 104 milk samples obtained from bulk tanks by PCR for *S. aureus* detection. Sensitivity value was 99% with moderate analytical agreement with microbiological culture in positive samples – the routine method has resulted 176 (56.41%) negative samples that were positive by PCR. However, there were no differences between individual PCR and mPCR for *S. aureus* detection in the present study (Table 4), and similar results were obtained by Riffon et al. (19), which used mPCR to detect *S. aureus* and other five bacterial mastitis pathogens in milk samples collected from animal quarters. Detection level was  $5 \times 10^3$  CFU/mL for all evaluated microorganisms by mPCR and individual PCR. Cremonesi et al. (13) examined 93 milk samples for *S. aureus* detection and 10 genes that codify staphylococcal toxins. The minimum detection level was equal (10 CFU/mL) between individual PCR and mPCR.

Table 4. *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* DNA detection levels by individual PCRs and mPCR using SAU1 and SAU2, SIP3 and SIP4, and Ecoli1 and Ecoli2 primers.

	SAU1 and SAU2	SAGA1 and SAGA2	SIP3 and SIP4	Ecoli1 and Ecoli2
Individual PCR	100µg	100µg	1000µg	10µg
mPCR†	100µg	UN	100µg	100µg
mPCR‡	100µg	UN	100µg	100µg

† ATCCs individually evaluated

‡ ATCCs together

UN: unused because mPCR products size for *S. agalactiae* (590bp) is very similar to *E. coli* mPCR products (660bp), that would difficult the identification by electrophoresis.

µg: picogram

Generally, despite the mPCR accuracy was 78.3% for simultaneous detection of *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli*, the sensitivity of molecular method was low (37.5%). These results were distinct from those obtained by Phuektes et al. (4), which used the mPCR for *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. uberis* detection in 117 milk samples collected from cows with subclinical mastitis. The mPCR showed better sensitivity values than microbiological culture for *S. aureus* and *S. uberis* detection, presenting  $10^4$  CFU/mL and  $10^3$  CFU/mL detection levels for each microorganism, respectively. However, no significant differences between mPCR and culture were verified for *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* detection.

Specificity value by mPCR of the present study was 93.2%, similar to the results reported in previous studies, ranging from 96.3% to 100% (3,7,20). Better detection levels for *S. agalactiae* were obtained by mPCR when compared to the individual PCR for this specific pathogen. These data are different from the ones obtained in other studies (4,6,21).

No differences between detection levels for *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* were observed when mPCR was processed with the extracted DNAs from standard strains, either composed or individual. These data suggests that no interference between bacterial agents occurred, despite the different concentrations levels of each pathogen that normally occurs in milk samples.

After five repetitions of mPCR specificity tests using *Streptococcus intermedius*, *S. epidermidis*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* and *P. aeruginosa* standard strains (ATCCs), it was verified that no DNA of these microorganisms was amplified, suggesting the specific detection of *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* DNA by mPCR. These results were similar to those obtained by Riffon et al. (19), which used a mPCR protocol to detect *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* and *S. uberis* in milk samples inoculated with standard strains of each microorganism, isolated from mastitis cases. Seven specie-specific pairs of primers were used and no other DNAs were detected, but only the specific target

ones. In the same way, after five repetitions of mPCR in random milk samples, the results observed in the present study were identical, demonstrating the test reproducibility.

## CONCLUSIONS

According to the presented results, it is possible to conclude that the mPCR protocol was highly accurate for *E. coli* and *S. agalactiae* detection in bulk tank milk samples, but failed to detect *S. aureus*.

## ACKNOWLEDGMENTS

To “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP) for financial support (Proc. #2008/04125-4 and #2008/11362-2).

## REFERENCES

1. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa 51 de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite. Diário Oficial da União. 2002 Sept 20; Sec 1:13.
2. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa 62 de 29 de dezembro de 2011. Alterar o caput, excluir o parágrafo único e inserir os §§ 1º ao 3º, todos do art. 1º, da Instrução Normativa MAPA nº 51 de 18 de setembro de 2002. Diário Oficial da União. 2011 Dec 29; Sec 1:6.
3. Gillespie BE, Oliver SP. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction. J Dairy Sci. 2005;88:3510-8.
4. Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. J Dairy Sci. 2001;84:1140-8.
5. Phuektes P, Browning GF, Anderson G, Mansell PD. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. J Dairy Res. 2003;70:149-55.
6. Silva MA. Utilização de PCR Multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
7. Maxwell ML, Gillespie BE, Oliver SP. Real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of mastitis pathogens directly from milk. In: Proceedings of NMC Annual Meeting; 2008; New Orleans. New Orleans; 2008. p.212-3.
8. Carneiro DMVF. Detecção microbiológica e molecular de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão – correlação com resíduos de antibióticos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2009.
9. Quinn PJ, Markey B, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed; 2005.

10. Chótar M, Vidova B, Godany A. A development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. *Folia Microbiol.* 2006;51:639-46.
11. Mackinnon A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Comput Biol Med.* 2000;30:127-34.
12. Moussa IM, Ashgan MH, Alwathnani HA, Mohamed KHF, Al-Doss AA. Multiplex polymerase chain reaction for detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC). *Afr J Biotechnol.* 2010;9:4356-63.
13. Cremonesi P, Castiglioni B, Malferrari G, Biunno I, Vimercati C, Moroni P, et al. Technical note: improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. *J Dairy Sci.* 2006;89:163-9.
14. Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM. An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2008;60:299-306.
15. Zocche F, Bastos CP, Silva WP. Detecção de genes do *cluster egc* em *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal. *Cienc Rural.* 2010;40:1134-40.
16. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 2006;89:1877-95.
17. Yamagishi N, Jinkawa Y, Omoe K, Makino S, Oboshi K. Sensitive test for screening for *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis by broth cultivation and PCR. *Vet Rec.* 2007;161:381-3.
18. Faccioli PY. Detecção molecular de *Staphylococcus aureus* e de suas toxinas no leite de tanque de rebanhos bovinos, em condições de refrigeração e sob temperatura ambiente [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2010.
19. Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagacé J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2584-9.
20. Silvennoinen M, Holopainen J, Koskinen MT. Pathoproof mastitis PCR assay and sensitivity validation of a new test kit for rapid identification of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Mycoplasma bovis* in bovine milk. In: Proceedings of Annual Meeting of the National Mastitis Council; 2010; Albuquerque, New Mexico. Albuquerque, New Mexico; 2010. p.240-1.
21. Ramesh A, Padmapriya BP, Chrashekar A, Varadaraj MC. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Mol Cell Probes.* 2002;16:307-14.

**Recebido em: 24/05/2014**

**Aceito em: 14/10/2015**

## AVALIAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO E LÁCTEO EM OVELHAS GESTANTES SUPLEMENTADAS COM MONENSINA SÓDICA

Elizabeth Hortêncio F. Lima<sup>1</sup>  
Rodolfo J. C. Souto<sup>2</sup>  
Saulo de Tarso G. da Silva<sup>1</sup>  
Jobson F. P. Cajueiro<sup>1</sup>  
Carla Lopes de Mendonça<sup>3</sup>  
Pierre Castro Soares<sup>4</sup>  
José Augusto B. Afonso<sup>3\*</sup>

### RESUMO

O período do periparto nas ovelhas representa um dos mais complexos na vida produtiva, em função das modificações metabólicas e hormonais ocorridas, devido a maior demanda energética que sofre para atender o crescimento dos fetos e a lactação. Este estudo tem por objetivo estudar o perfil hematológico e bioquímico em ovelhas durante o período do periparto suplementadas com monensina sódica. Foram utilizadas 13 ovelhas da raça Santa Inês, prenhes, clinicamente sadias. Dois grupos foram formados aleatoriamente, um grupo controle recebendo volumoso, ração balanceada e sal mineral e outro grupo que recebeu além do volumoso, ração balanceada contendo 30 mg de monensina/dia e sal mineral com monensina. Amostras de sangue foram coletadas aos 60, 50, 40, 30, 20, 10 dias antes do parto, no momento do parto e aos 10, 20 e 30 dias pós-parto para realização do hemograma e das variáveis bioquímicas AST, GGT, FA, CK, creatinina, colesterol e triglicerídeos. Além de alguns componentes do leite (densidade, lactose, gordura, proteína, extrato seco desengordurado, pH e acidez Dornic). Para a análise estatística foi utilizada a ANOVA ( $P < 0,05$ ). Com relação aos valores hematológicos nos diferentes períodos fisiológicos estudados, não foi observado diferença significativa ( $P > 0,05$ ), com exceção do leucograma que revelou uma discreta leucocitose por neutrofilia no momento do parto de forma significativa ( $P < 0,05$ ) nos dois grupos. A atividade enzimática da AST apresentou-se mais elevada no grupo controle ( $P < 0,05$ ) durante o pós-parto e diferenças significativas também foram registradas entre os grupos, 10 dpp e 20 dpp ( $P < 0,05$ ) sendo mais elevada no grupo controle quando comparada ao monensina. Não houve diferença nos valores de colesterol e componentes do leite ( $P > 0,05$ ). Efeito de momento ( $P < 0,05$ ) foi observado com relação aos triglicerídeos nos dois grupos, sendo mais elevados no período pré-parto. A suplementação da monensina sódica neste estudo, não influenciou na melhoria dos indicadores estudados.

**Palavras-chave:** ovinos, periparto, ionóforos, metabolismo, leite.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Bom Pastor s/n, Boa Vista, Campus Garanhuns, PE 55290-000, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-030, Brasil.

<sup>3</sup> Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns, UFRPE, Av. Bom Pastor s/n, Boa Vista, Cx. Postal 152, Garanhuns, PE 55292-270, Brasil. \* Autor para correspondência.

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE.

## EVALUATION OF HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROFILE IN PREGNANT EWES SUPPLEMENTED WITH MONENSIN

### ABSTRACT

The peripartum period in sheep breeding is one of the most complex in the productive life, due to the metabolic and hormonal changes that occur to meet fetal growth and lactation. This study aims to study the biochemical and hematological parameters in sheep during the peripartum supplemented with monensin. It were used 13 Santa Inês sheep, pregnant, clinically healthy. Two groups were formed randomly, a control group receiving roughage, balanced feed and mineral salt and another group that received beyond roughage, balanced ration containing 30 mg monensin/day and mineral salt with monensin. Blood samples were collected at 60, 50, 40, 30, 20, 10 days before birth, at birth and at 10, 20 and 30 days postpartum for the complete blood count and biochemical variables AST, GGT, ALP, CK, creatinine, cholesterol and triglycerides. For statistical analysis ANOVA was used ( $P < 0.05$ ). With regard to haematological values in different physiological periods studied, there was no significant difference ( $P > 0.05$ ), except for the white blood count revealed a mild leukocytosis with neutrophilia at birth significantly ( $P < 0.05$ ) in two groups. The enzymatic activity of AST levels were more elevated in the control group ( $P < 0.05$ ) during the postpartum period and significant differences were also recorded between groups, no 10 dpp and 20 dpp ( $P < 0.05$ ) and higher in the control group compared to monensin. There was no difference in cholesterol ( $P > 0.05$ ). Effect of time ( $P < 0.05$ ) was observed with respect to triglycerides in both groups, being higher in the pre-partum. The supplementation of monensin in this study did not influence the improvement of the indicators studied.

**Keywords:** sheep, peripartum, ionophores, metabolism, milk.

## EVALUACIÓN DE LOS PERFILES HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y LECHOSO EN OVEJAS EN EMBARAZO SUPLEMENTADAS CON MONENSINA SÓDICA

### RESUMEN

El tramo de periparto en las ovejas es uno de los más complejos en la vida productiva en función de los cambios metabólicos y hormonales que ocurren bajo el incremento de la demanda de energía para el desarrollo y crecimiento del feto y la lactancia. Este estudio tiene como objetivo estudiar los perfiles hematológicos, bioquímicos y lechoso en las ovejas durante el periparto suplementado con monensina. Se utilizaron 13 ovejas de la raza Santa Inês, embarazadas y clínicamente sanas. Se hicieron dos grupos al azar, un primer grupo de control que recibió a su turno volúmenes de alimento balanceado y sal mineral, y un segundo grupo al cual fue suministrado 30 mg adicionales de monestina al día en los mismos volúmenes de la dieta equilibrada. Se tomaron muestras de sangre a los 60, 50, 40, 30, 20 y 10 días antes del parto, en el parto y en los 10, 20 y 30 días tras el parto para el conteo sanguíneo completo y de las variables bioquímicas AS, GGT, FA, CK, creatinina, colesterol y triglicéridos. Además de unos componentes de la leche (densidad, lactosa, grasa, proteína, extracto seco sin grasa, el pH y la acidez Dornic). Se utilizó para el análisis estadístico la ANOVA ( $p < 0,05$ ). Con respecto a los valores hematológicos en diferentes períodos fisiológicos investigados, no se observó diferencia significativa ( $P > 0,05$ ), excepto que el leucograma (WBC) ha revelado una ligera leucocitosis con neutrofilia en el parto de manera significativa ( $P < 0,05$ ) en los dos grupos. La actividad enzimática de AST se presentó mayor en el grupo control ( $P < 0,05$ ) durante el puerperio y también hubo registro de diferencias



significativas entre los grupos, en los 10 DPP y 20 DPP ( $P < 0,05$ ) siendo incrementada en el grupo de control en comparación con la monensina. No hubo diferencias en los valores de colesterol y componentes de la leche ( $P > 0,05$ ). Efecto del momento ( $P < 0,05$ ) fue observado en la relación con los triglicéridos en ambos grupos, presentándose mayor en el período de pre-parto. Así, la suplementación de la monensina sodica en este estudio, no influyó en la mejora de los indicadores investigados.

**Palabras clave:** ovelhas, periparto, ionóforos, metabolismo, la leche.

## INTRODUÇÃO

A criação de ovinos visando o melhoramento genético do rebanho nacional tem assumido grandes proporções, principalmente com relação à raça Santa Inês, que vem se destacando devido às características importantes, além da produção de carne, como prolificidade, produção de leite considerável e capacidade de adaptação às condições adversas (1).

Nas ovelhas, a demanda de nutrientes aumenta durante a gestação, particularmente nas últimas seis semanas, quando ocorre maior desenvolvimento do feto alcançando aproximadamente 70% do seu crescimento, aliado ao requerimento de nutrientes para o desenvolvimento mamário (2).

O período entre o final da gestação e o início da lactação tem sido considerado o estágio de maior interesse do ciclo produtivo. Esse intervalo é conhecido como período de transição (periparto) e compreende as três últimas semanas que antecedem o parto e as três primeiras após o parto. Este período é acompanhado de diversas alterações anatômicas, hormonais e metabólicas devido à preparação para o parto e início da lactação. Essas modificações no perfil metabólico em rebanhos de ovelhas podem predispor a ocorrência de transtornos metabólicos (3).

Entre as enfermidades de maior ocorrência nesse período, a toxemia da prenhez se destaca. Também conhecida como cetose, acomete ovelhas em maior frequência no último mês de gestação. A adoção de práticas preventivas no manejo alimentar em ovelhas com a finalidade de minimizar o impacto proveniente deste distúrbio metabólico e o emprego de alguns compostos, como os ionóforos, na alimentação para suprir a demanda energética crescente neste período de produção tem sido motivo de vários estudos (4).

A monensina sódica é um dos ionóforos mais aplicados na dieta de ruminantes devido às modificações positivas que promove na população microbiana ruminal. O uso dos ionóforos em ovinos tem sido mais evidente como coccidiostático, na melhoria da eficiência alimentar em borregos e no controle da acidose láctica ruminal (5,6).

Todavia, diante da escassez de estudos na região sobre o uso da monensina sódica como componente da dieta, com a finalidade de melhor atender a demanda energética nas ovelhas no momento considerado crítico, como o periparto, este estudo tem por objetivo avaliar o efeito da monensina sódica sobre o perfil hematológico, bioquímico e lácteo em ovelhas Santa Inês durante o periparto.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Animais, manejo e alimentação.** O experimento foi realizado na Clínica de Bovinos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Garanhuns, PE, no aprisco de experimentação de pequenos ruminantes. Foram utilizadas 13 ovelhas gestantes clinicamente

sadias, primíparas e múltíparas (2ª cria), da raça Santa Inês, com peso médio de 50 Kg, vacinadas<sup>5</sup> e vermifugadas<sup>6</sup>.

As ovelhas foram, de forma aleatória, subdivididas em dois grupos, com sete animais no grupo que recebeu a monensina e seis no controle. Ao grupo controle, foi fornecido volumoso - Capim elefante (*Pennisetum purpureum*), tifton (*Cynodom* sp.) - ração balanceada, 400g/animal/dia (farelo de soja 16%, farelo de trigo 37% e farelo de milho 47%) e sal mineral para ovinos<sup>7</sup>, o grupo tratado recebeu, além do volumoso, a monensina sódica fornecida na ração<sup>8</sup>, 400g/animal/dia, e no sal mineral<sup>9</sup>, permitindo um consumo de 30 mg por animal/dia, no decorrer de toda gestação e lactação. Com a finalidade de adaptação, a dieta foi oferecida aos animais 15 dias antes de se iniciar a colheita, a água era *ad libitum*. Os animais foram submetidos ao exame clínico (7), e ultrassonográfico para diagnóstico da gestação (Ultrason GE, modelo Logic 100 pro).

**Momentos experimentais.** As observações clínicas no decorrer do experimento e a colheita das amostras para exames laboratoriais foram efetuadas nos períodos de 60, 50, 40, 30, 20 e 10 dias antes do parto, no momento do parto e nos períodos 10, 20 e 30 dias pós-parto, em função das modificações metabólicas e hormonais que ocorrem neste período (1,8).

**Colheita das amostras.** As amostras de sangue foram colhidas às oito horas da manhã, antes da oferta da primeira dieta do dia, por venopunção jugular com agulha 25x8mm em tubos siliconizados vacutainer com EDTA a 10% para realização do hemograma. As amostras de sangue para obtenção de soro foram colhidas em tubos siliconizados vacutainer e centrifugadas (centrífuga Fanem Ltda, Baby I, Mod.206) a 3500rpm por cinco minutos. As amostras foram condicionadas sob a forma de alíquotas de soro em tubos tipo *ependorf* e armazenadas em ultra freezer à temperatura de -80° C (Ultralow freezer NuAire Inc.) para posterior análises bioquímicas. As amostras de leite foram colhidas por meio de ordenha manual com separação prévia dos borregos, 8h antes da colheita.

**Análise laboratorial.** Foram realizados hemograma, determinação da proteína plasmática total e fibrinogênio (9). No soro sanguíneo, foram mensurados os metabólitos creatinina (Labtest Diagnóstica S.A); colesterol (Colesterol liquiform Labtest Diagnóstica S.A), triglicérides (Triglicérides liquiform Labtest Diagnóstica S.A). Dentre as enzimas, avaliou-se a atividade sérica da aspartato aminotransferase (AST/GOT Liquiform Labtest Diagnóstica S.A), fosfatase alcalina (Fosfatase alcalina Liquiform Labtest Diagnóstica S.A), gama glutamiltransferase (Gama GT Liquiform Labtest Diagnóstica S.A) e creatina quinase (CK-NAC Liquiform Labtest Diagnóstica S.A). As leituras foram efetuadas a 37°C em analisador bioquímico semi-automático Labquest<sup>10</sup>(Labtest Diagnóstica S.A). As amostras de leite foram analisadas para a determinação da densidade, lactose, gordura, proteína, extrato seco desengordurado, pH e acidez Dornic<sup>11</sup>.

**Análise estatística.** Os valores obtidos foram analisados estatisticamente ao longo dos dez momentos experimentais, comparando-os entre si, nos quais as variáveis estudadas foram submetidas à análise de variância. As estatísticas F calculadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Os contrastes entre as médias foram realizados pelo método de Tukey, calculando-se a diferença mínima significativa (dms) para  $\alpha = 0,05$ . Para a análise das variáveis tendo a mediana como medida de tendência central, foram utilizados métodos analíticos não paramétricos de Mann Whitney para amostras independentes, e a prova de

<sup>5</sup> Covexin 9, Coopers Brasil Ltda.

<sup>6</sup> Cydectin oral, Fort Dodge

<sup>7</sup> Ovinofós - Tortuga

<sup>8</sup> Max Ovino Reprodução (com monensina sódica) - Rancho Alegre Produtos Agropecuários LTDA.

<sup>9</sup> Ovinofós com monensina - Tortuga

<sup>10</sup> Labquest, Labtest Diagnóstica S.A, Lagos Santa, MG.

<sup>11</sup> Analisador de leite Ekomilk.

Friedman para amostras dependentes, usando o  $\chi^2$  e calculando a dms para  $\alpha = 0,05$  (10). Empregou-se o programa computacional *Sigma Stat*.

O trabalho obteve parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco com a licença n. 047/2013 (5001/2012 A14) CEPE/ UFRPE de acordo com as normas do COBEA e *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se os resultados do hemograma, constatou-se que, para os índices hematimétricos e fibrinogênio plasmático, não ocorreu efeito de momento nem de grupos ( $P>0,05$ ) (Tabela 1) e que os valores obtidos se encontravam dentro da faixa de normalidade para a espécie (9). Quanto ao leucograma, foi verificada uma discreta leucocitose por neutrofilia em ambos os grupos, no momento do parto que diferiu de forma significativa ( $P<0,05$ ) em relação aos outros dois períodos (pré e pós-parto), no grupo monensina (Figura 1, Tabela 1). Não existiu efeito de grupo ( $P>0,05$ ). Esta alteração ocorrida está relacionada à condição clínica de estresse observada nas ovelhas no momento do parto, em que a liberação de corticoides endógenos é bem expressiva neste momento e interfere na resposta leucocitária (11).

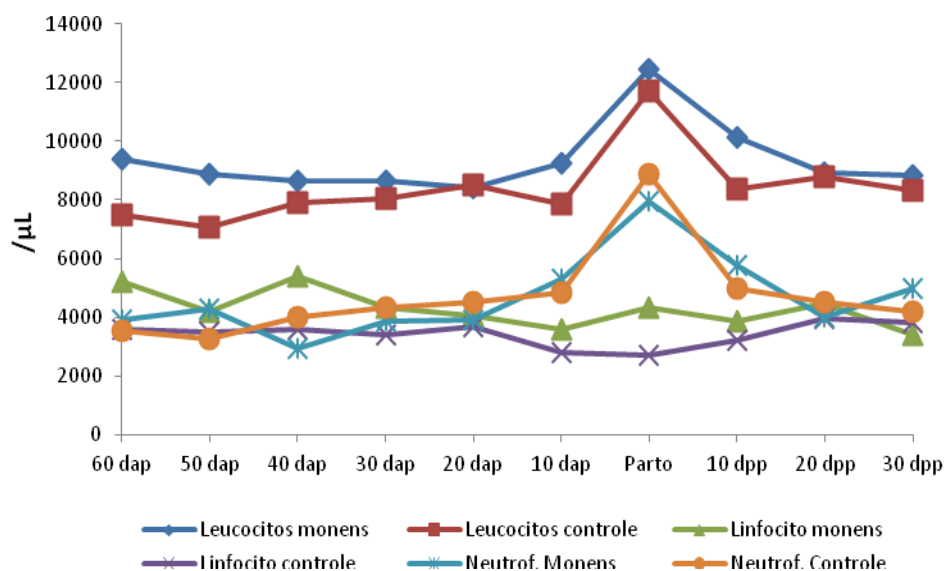


Figura 1. Valores médios da contagem de leucócitos, linfócitos e neutrófilos ( $\mu\text{L}$ ) das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle antes (dap), durante e após o parto (dpp).

Analisando o efeito de momento, para a variável aspartato aminotransferase (AST), verificou-se elevação significativa ( $P<0,001$ ) dos valores no grupo controle após o parto, em relação aos momentos do pré-parto e parto. A média dos valores para a AST do grupo controle ao longo dos momentos foi mais elevada quando comparada ao grupo monensina, com diferenças significativas ( $P<0,02$ ) encontradas no 10ºdpp e 20ºdpp (Figura 2, Tabela 2). Resultados semelhantes foram descritos em ovelhas (12), em cabras leiteiras (13) e aos encontrados em bovinos, com valores de AST mais baixos no pós-parto em vacas que receberam monensina em sua dieta, atribuindo o feito benéfico em função do aumento da concentração de glicose e a reduzida concentração de  $\beta$ -hidroxibutirato, causando uma redução na mobilização de AGNE e deposição de gordura no fígado (14,15). Embora diferentes causas para provocar elevação na concentração de AST não são específicas de dano

hepático, a observada redução da atividade sérica desta enzima nos animais que receberam o ionóforo demonstra alguma melhora na função hepática, apesar dos valores de AST no presente estudo, em ambos os grupos, se encontrarem dentro da faixa de normalidade para ovinos (16).

Tabela 1. Valores médios, respectivos desvios padrão ( $x \pm s$ ) e mediana do perfil hematológico das ovelhas suplementadas com monensina sódica (M) e do controle (C), antes (dap), durante e após o parto (dpp).

Momentos Experimentais		Variáveis										
		Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	Hemoglobina (g/dL)	Volume Globular (%)	VCM (fL)	CHCM (%)	PPT (g/dL)	Fibrinogênio (mg/dL)	Leucócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	Linfócitos ( $\mu\text{L}$ )	Neutrófilos ( $\mu\text{L}$ )	Eosinófilos ( $\mu\text{L}$ )
60 dap	M	9,82 <sup>aA</sup> $\pm 0,78$	10,90 <sup>aA</sup> $\pm 0,87$	30,86 <sup>aA</sup> $\pm 2,19$	31,48 <sup>aA</sup> $\pm 1,94$	35,33 <sup>aA</sup> $\pm 1,40$	6,99 <sup>aA</sup> $\pm 0,68$	242,86 <sup>aA</sup> $\pm 151,19$	9407 <sup>cdA</sup> $\pm 1563$	5194 <sup>aA</sup> $\pm 2147$	3926 <sup>acdA</sup> $\pm 1282$	85 <sup>aA</sup> 72- 190
	C	9,53 <sup>aA</sup> $\pm 0,78$	10,71 <sup>aA</sup> $\pm 0,80$	30,17 <sup>aA</sup> $\pm 1,83$	31,78 <sup>aA</sup> $\pm 2,91$	35,46 <sup>aA</sup> $\pm 0,94$	6,95 <sup>aA</sup> $\pm 0,39$	283,33 <sup>aA</sup> $\pm 98,32$	7467 <sup>aA</sup> $\pm 1733$	3596 <sup>aA</sup> $\pm 873$	3528 <sup>aA</sup> $\pm 865$	214 <sup>aA</sup> 190-246
50 dap	M	9,34 <sup>aA</sup> $\pm 0,69$	10,35 <sup>aA</sup> $\pm 1,24$	30,14 <sup>aA</sup> $\pm 2,27$	32,47 <sup>aA</sup> $\pm 3,89$	34,33 <sup>aA</sup> $\pm 3,45$	6,93 <sup>aA</sup> $\pm 0,62$	242,86 <sup>aA</sup> $\pm 139,73$	8864 <sup>adA</sup> $\pm 1502$	4193 <sup>aA</sup> $\pm 1719$	4285 <sup>acdA</sup> $\pm 1664$	330 <sup>aA</sup> 192-379
	C	9,08 <sup>aA</sup> $\pm 0,88$	10,32 <sup>aA</sup> $\pm 1,30$	29,67 <sup>aA</sup> $\pm 3,93$	32,82 <sup>aA</sup> $\pm 4,68$	34,85 <sup>aA</sup> $\pm 1,52$	6,83 <sup>aA</sup> $\pm 0,61$	233,33 <sup>aA</sup> $\pm 103,28$	7050 <sup>aA</sup> $\pm 2157$	3513 <sup>aA</sup> $\pm 1615$	3260 <sup>aA</sup> $\pm 760$	186 <sup>aA</sup> 103-290
40 dap	M	9,79 <sup>aA</sup> $\pm 0,87$	10,96 <sup>aA</sup> $\pm 0,54$	32,29 <sup>aA</sup> $\pm 1,80$	33,14 <sup>aA</sup> $\pm 2,51$	33,98 <sup>aA</sup> $\pm 1,76$	7,11 <sup>aA</sup> $\pm 0,60$	228,57 <sup>aA</sup> $\pm 95,12$	8650 <sup>adA</sup> $\pm 1632$	5403 <sup>aA</sup> $\pm 1475$	2922 <sup>acdA</sup> $\pm 1134$	159 <sup>aA</sup> 98-257
	C	9,78 <sup>aA</sup> $\pm 1,07$	10,97 <sup>aA</sup> $\pm 1,21$	31,67 <sup>aA</sup> $\pm 3,56$	32,49 <sup>aA</sup> $\pm 3,01$	34,45 <sup>aA</sup> $\pm 0,90$	7,10 <sup>aA</sup> $\pm 0,20$	383,33 <sup>aA</sup> $\pm 147,20$	7929 <sup>aA</sup> $\pm 2996$	3591 <sup>aA</sup> $\pm 1583$	4028 <sup>aA</sup> $\pm 2108$	168 <sup>aA</sup> 100-242
30 dap	M	9,57 <sup>aA</sup> $\pm 0,52$	11,28 <sup>aA</sup> $\pm 1,19$	31,57 <sup>aA</sup> $\pm 1,99$	33,05 <sup>aA</sup> $\pm 2,23$	35,69 <sup>aA</sup> $\pm 2,47$	6,87 <sup>aA</sup> $\pm 0,62$	257,14 <sup>aA</sup> $\pm 151,19$	8657 <sup>adA</sup> $\pm 1408$	4351 <sup>aA</sup> $\pm 1129$	3858 <sup>acdA</sup> $\pm 1283$	475 <sup>aA</sup> 361-545
	C	9,19 <sup>aA</sup> $\pm 0,62$	10,56 <sup>aA</sup> $\pm 0,82$	29,17 <sup>aA</sup> $\pm 3,19$	31,70 <sup>aA</sup> $\pm 2,65$	36,38 <sup>aA</sup> $\pm 2,55$	6,73 <sup>aA</sup> $\pm 0,47$	233,33 <sup>aA</sup> $\pm 136,63$	8042 <sup>aA</sup> $\pm 2882$	3412 <sup>aA</sup> $\pm 730$	4332 <sup>aA</sup> $\pm 2566$	216 <sup>aA</sup> 76-302
20 dap	M	9,13 <sup>aA</sup> $\pm 0,66$	10,61 <sup>aA</sup> $\pm 0,63$	31,14 <sup>aA</sup> $\pm 1,21$	34,26 <sup>aA</sup> $\pm 3,0$	34,09 <sup>aA</sup> $\pm 2,22$	6,81 <sup>aA</sup> $\pm 0,57$	314,29 <sup>aA</sup> $\pm 167,62$	8400 <sup>adA</sup> $\pm 2033$	4064 <sup>aA</sup> $\pm 1231$	3930 <sup>acdA</sup> $\pm 1363$	371 <sup>aA</sup> 150-473
	C	9,66 <sup>aA</sup> $\pm 0,63$	10,63 <sup>aA</sup> $\pm 1,11$	30,50 <sup>aA</sup> $\pm 2,88$	31,68 <sup>aA</sup> $\pm 2,33$	34,77 <sup>aA</sup> $\pm 2,11$	6,87 <sup>aA</sup> $\pm 0,43$	316,67 <sup>aA</sup> $\pm 75,28$	8488 <sup>aA</sup> $\pm 2980$	3680 <sup>aA</sup> $\pm 1592$	4524 <sup>aA</sup> $\pm 2096$	0 <sup>aA</sup> 0-85
10 dap	M	9,59 <sup>aA</sup> $\pm 0,91$	11,17 <sup>aA</sup> $\pm 0,82$	32,29 <sup>aA</sup> $\pm 2,29$	33,77 <sup>aA</sup> $\pm 2,40$	34,64 <sup>aA</sup> $\pm 2,03$	6,79 <sup>aA</sup> $\pm 0,54$	300,00 <sup>aA</sup> $\pm 129,10$	9264 <sup>cdA</sup> $\pm 2329$	3596 <sup>aA</sup> $\pm 894$	5295 <sup>cdA</sup> $\pm 1912$	244 <sup>aA</sup> 110-365
	C	9,31 <sup>aA</sup> $\pm 0,71$	10,89 <sup>aA</sup> $\pm 1,04$	30,33 <sup>aA</sup> $\pm 4,08$	32,54 <sup>aA</sup> $\pm 3,30$	36,09 <sup>aA</sup> $\pm 2,41$	6,67 <sup>aA</sup> $\pm 0,30$	283,33 <sup>aA</sup> $\pm 98,32$	7842 <sup>aA</sup> $\pm 2141$	2808 <sup>aA</sup> $\pm 880$	4833 <sup>aA</sup> $\pm 1908$	72 <sup>aA</sup> 52-180
Parto	M	9,55 <sup>aA</sup> $\pm 1,48$	11,62 <sup>aA</sup> $\pm 1,18$	32,14 <sup>aA</sup> $\pm 1,35$	33,79 <sup>aA</sup> $\pm 4,62$	36,12 <sup>aA</sup> $\pm 2,80$	6,46 <sup>aA</sup> $\pm 0,34$	200,00 <sup>aA</sup> $\pm 0,00$	12471 <sup>bcA</sup> $\pm 2670$	4319 <sup>aA</sup> $\pm 1646$	7964 <sup>bc</sup> $\pm 3067$	127 <sup>aA</sup> 20-153
	C	9,93 <sup>aA</sup> $\pm 1,13$	10,87 <sup>aA</sup> $\pm 1,27$	30,33 <sup>aA</sup> $\pm 3,44$	30,69 <sup>aA</sup> $\pm 3,34$	35,86 <sup>aA</sup> $\pm 1,82$	6,38 <sup>aA</sup> $\pm 0,31$	250,00 <sup>aA</sup> $\pm 83,67$	11725 <sup>aA</sup> $\pm 776$	2709 <sup>aA</sup> $\pm 1117$	8883 <sup>aA</sup> $\pm 784$	62 <sup>aA</sup> 0-219
10 dpp	M	9,37 <sup>aA</sup> $\pm 0,67$	11,44 <sup>aA</sup> $\pm 0,49$	31,86 <sup>aA</sup> $\pm 1,68$	34,07 <sup>aA</sup> $\pm 1,53$	36,03 <sup>aA</sup> $\pm 3,07$	6,94 <sup>aA</sup> $\pm 0,48$	314,29 <sup>aA</sup> $\pm 121,50$	10121 <sup>abcA</sup> $\pm 3085$	3884 <sup>aA</sup> $\pm 1649$	5772 <sup>cdA</sup> $\pm 2476$	317 <sup>aA</sup> 157-446
	C	9,46 <sup>aA</sup> $\pm 0,76$	10,84 <sup>aA</sup> $\pm 1,12$	30,33 <sup>aA</sup> $\pm 2,94$	32,12 <sup>aA</sup> $\pm 2,55$	35,74 <sup>aA</sup> $\pm 1,55$	6,93 <sup>aA</sup> $\pm 0,35$	316,67 <sup>aA</sup> $\pm 132,92$	8350 <sup>aA</sup> $\pm 1717$	3234 <sup>aA</sup> $\pm 1276$	4981 <sup>aA</sup> $\pm 1387$	0 <sup>aA</sup> 0-143
20 dpp	M	9,48 <sup>aA</sup> $\pm 0,61$	11,23 <sup>aA</sup> $\pm 0,81$	31,71 <sup>aA</sup> $\pm 3,09$	33,51 <sup>aA</sup> $\pm 3,15$	35,52 <sup>aA</sup> $\pm 2,04$	6,76 <sup>aA</sup> $\pm 0,44$	314,29 <sup>aA</sup> $\pm 89,97$	8936 <sup>adA</sup> $\pm 1524$	4465 <sup>aA</sup> $\pm 804$	4020 <sup>acdA</sup> $\pm 985$	326 <sup>aA</sup> 179-466
	C	9,61 <sup>aA</sup> $\pm 1,03$	10,69 <sup>aA</sup> $\pm 1,14$	30,67 <sup>aA</sup> $\pm 3,39$	32,02 <sup>aA</sup> $\pm 2,85$	34,93 <sup>aA</sup> $\pm 2,49$	6,97 <sup>aA</sup> $\pm 0,23$	466,67 <sup>aA</sup> $\pm 216,02$	8783 <sup>aA</sup> $\pm 1523$	3960 <sup>aA</sup> $\pm 990$	4509 <sup>aA</sup> $\pm 1802$	171 <sup>aA</sup> 80-254
30 dpp	M	9,75 <sup>aA</sup> $\pm 0,96$	11,27 <sup>aA</sup> $\pm 0,78$	31,14 <sup>aA</sup> $\pm 3,08$	32,07 <sup>aA</sup> $\pm 2,98$	36,23 <sup>aA</sup> $\pm 3,70$	6,97 <sup>aA</sup> $\pm 0,36$	342,86 <sup>aA</sup> $\pm 78,68$	8857 <sup>adA</sup> $\pm 1582$	3404 <sup>aA</sup> $\pm 734$	4965 <sup>cdA</sup> $\pm 1769$	270 <sup>aA</sup> 161-609
	C	8,74 <sup>aA</sup> $\pm 0,77$	9,96 <sup>aA</sup> $\pm 1,41$	28,83 <sup>aA</sup> $\pm 2,71$	33,04 <sup>aA</sup> $\pm 2,32$	34,46 <sup>aA</sup> $\pm 2,50$	6,93 <sup>aA</sup> $\pm 0,36$	416,67 <sup>aA</sup> $\pm 204,12$	8342 <sup>aA</sup> $\pm 2613$	3802 <sup>aA</sup> $\pm 1378$	4208 <sup>aA</sup> $\pm 1890$	229 <sup>aA</sup> 115-255

- Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre os momentos em cada grupo ( $P < 0,05$ ).

- Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre os grupos em cada momento ( $P < 0,05$ ).

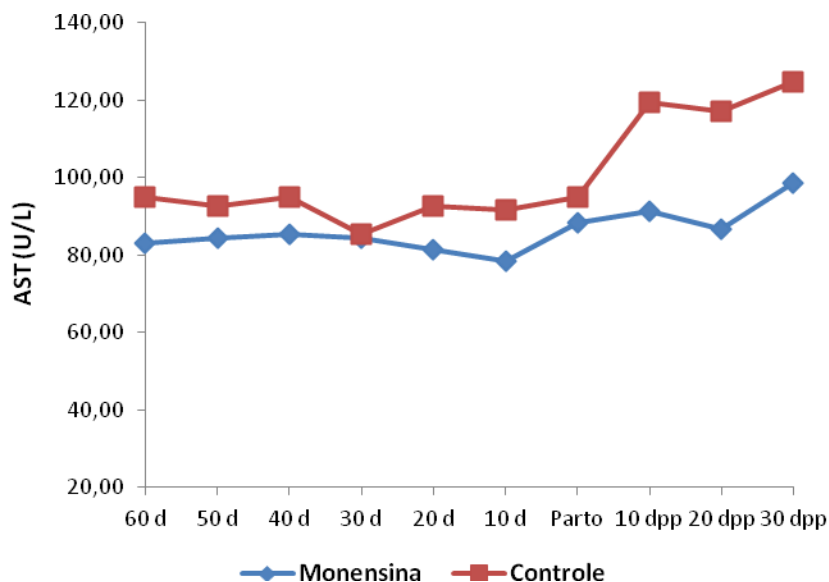


Figura 2. Valores médios da aspartato aminotransferase - AST (U/L) das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle antes (dap), durante e após o parto (dpp).

Não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nos valores da fosfatase alcalina (FA) ao longo dos momentos nos grupos estudados (Figura 3). Contudo, verificou-se diferença significativa ( $P < 0,03$ ) entre os grupos, no período de 30dap, no qual o maior valor médio foi observado no grupo monensina, porém, os valores encontrados em ambos os grupos se encontravam dentro da faixa de normalidade para a espécie (16).

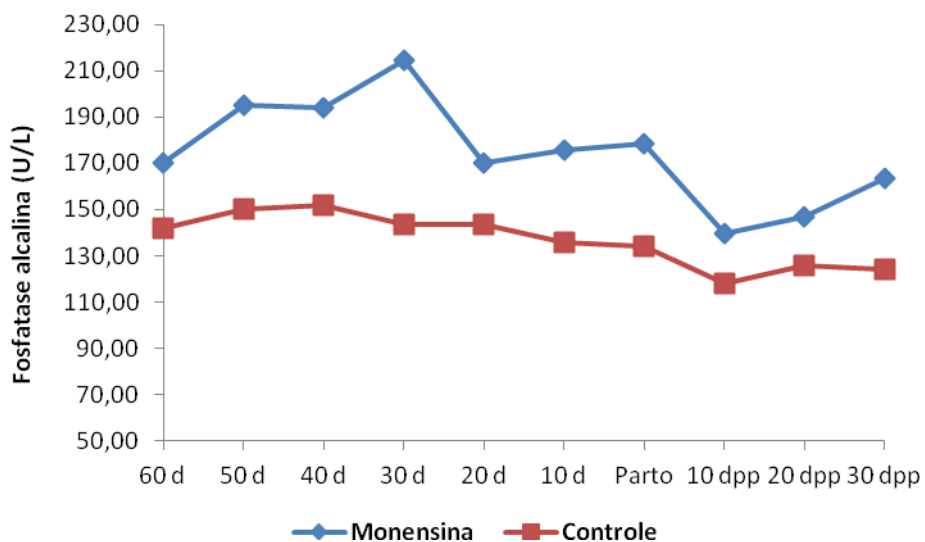


Figura 3. Valores médios da fosfatase alcalina (FA) (U/L) das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle antes (dap), durante e após o parto (dpp).

Ao se avaliar a atividade sérica da Gama glutamiltransferase (GGT) não ocorreu diferença significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Ao analisar o efeito de momento, constatou-se a elevação significativa ( $P < 0,05$ ), no 10º dia após o parto, cujos valores obtidos foram 74,31 ( $\pm 19,11$ ) e 67,58 ( $\pm 13,17$ ) nos grupos monensina e controle (Figura 4, Tabela 2). Esses resultados também foram relatados, trabalhando-se com ovelhas, no período do periparto, recebendo dietas com alta densidade energética (17). Vale ressaltar que os valores mostraram-

se um pouco acima do normal para a espécie, a elevação da GGT em ovinos e outros ruminantes está relacionada a uma colangite, porém, não foi diagnosticado comprometimento clínico nos animais durante o estudo (16,18).

Na avaliação da creatino quinase (CK), não houve efeito de grupo ( $P>0,05$ ), no entanto, ocorreu efeito de momento ( $P<0,05$ ) no dia do parto, nos grupos controle (145,7 U/L) e monensina (170 U/L), cujos valores se mostraram mais elevados em relação aos outros períodos (Figura 5, Tabela 5). Resultados semelhantes foram descritos, analisando-se o efeito do propilenoglicol, cobalto associado à vitamina B12, no periparto de ovelhas (19). A elevada atividade enzimática da CK, neste período, pode ser justificada devido às contrações do útero ocorridas no momento do parto.

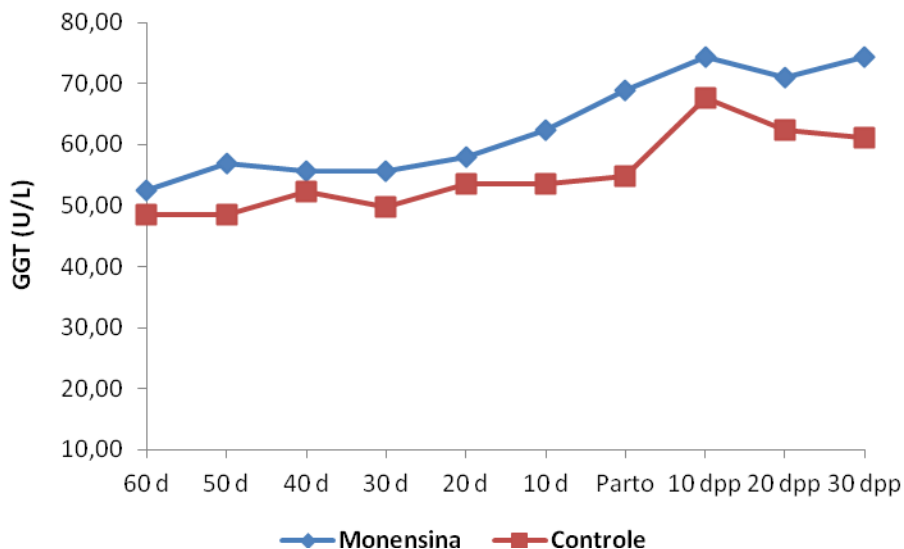


Figura 4. Valores médios da Gama glutamiltransferase - GGT (U/L) das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle antes (dap), durante e após o parto (dpp).

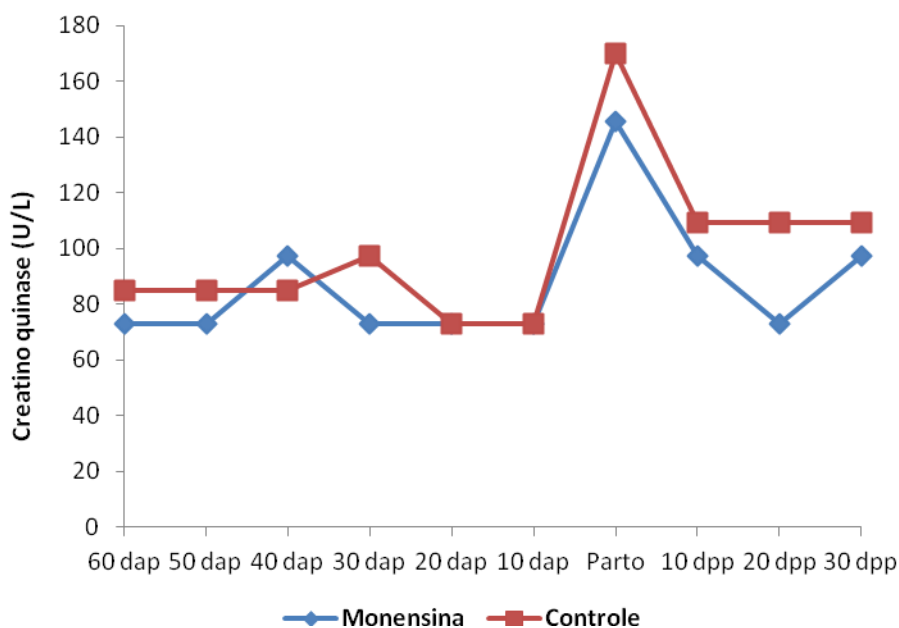


Figura 5. Valores médios da creatino quinase - CK (U/L) das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle antes (dap), durante e após o parto (dpp).

Com relação à creatinina, não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os grupos, nem entre momentos (Figura 6, Tabela 2). Os valores médios de creatinina, neste estudo, mantiveram-se ao longo dos momentos, nos dois grupos estudados, abaixo dos valores de referência para ovinos (16), resultados semelhantes também foram descritos, avaliando-se o perfil bioquímico em ovelhas durante a gestação e pós-parto (20) e em cabras de leite durante a gestação (21). Estes achados diferem dos encontrados (3) ao analisar o perfil metabólico e hormonal em ovelhas, e com o uso do propileno glicol durante o periparto em cabras leiteiras, em que os níveis de creatinina foram mais elevados (22). Ambos atribuíram esse achado a maior atividade de mobilização de proteína muscular.

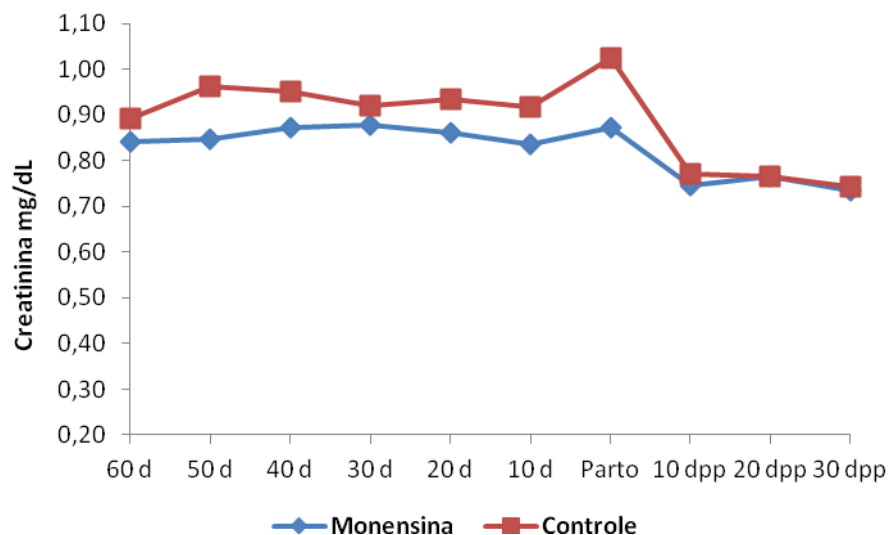


Figura 6. Valores médios da creatinina (mg/dL) das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle antes (dap), durante e após o parto (dpp).

Na análise do colesterol sérico, não ocorreu efeito de momento e nem de grupo ( $P>0,05$ ), estando os valores dentro da faixa de normalidade para a espécie ovina, de acordo com (16) e (23) trabalhando com ovelhas durante a gestação e lactação (Figura 7, Tabela 2). Os resultados foram semelhantes aos encontrados em ovelhas prenhas (12) e em cabras leiteiras no periparto, empregando a monensina na dieta (13). Todavia, divergem dos encontrados pela avaliação do efeito da monensina em vacas leiteiras no período de transição (24), os quais relataram níveis mais altos do colesterol sérico, sendo justificado devido a maior liberação de lipoproteínas a partir do fígado. Outra informação a considerar revelou o aumento gradual do colesterol e triglicerídeos no final da gestação em ovelhas, em decorrência dos níveis de insulina, que atua diretamente no metabolismo do tecido adiposo durante a gestação, e a diminuição da resposta do tecido alvo à insulina no final da gestação predispondo a elevação dos níveis destes componentes e das lipoproteínas (25).

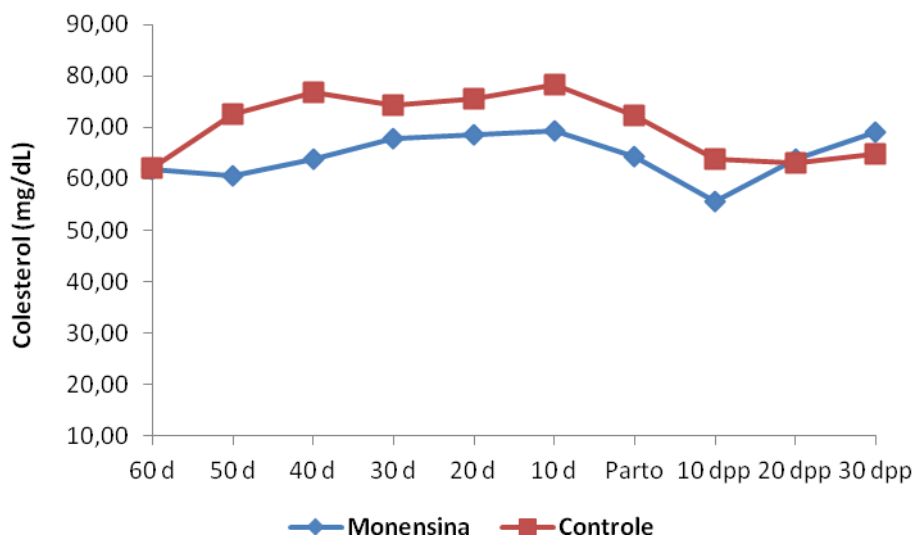


Figura 7. Valores médios do colesterol (mg/dL) das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle antes (dap), durante e após o parto (dpp).

Com relação às concentrações dos triglicerídeos, não houve efeito entre os grupos ( $P>0,05$ ), contudo, efeito de momento ( $P<0,05$ ) foi constatado no grupo controle, com elevação aos 20dap em relação ao pós-parto e no grupo monensina a maior média foi obtida aos 30dap em relação aos 50dap, parto e pós-parto. Em ambos os grupos, em relação aos demais momentos, os menores valores de triglicerídeos foram no pós-parto (Figura 8, Tabela 2). Analisando-se o perfil bioquímico em cabras leiteiras, (26) relataram que valores mais baixos de triglicerídeos observados no final da gestação e início da lactação podem ser justificados devido ao aumento da produção de leite, menor disponibilidade de ácidos graxos, lipólise para obtenção de energia e do maior aporte de triglicerídeos circulantes para a glândula mamária, para síntese de gordura do leite. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo com ovelhas prenhes (12) e avaliando o perfil metabólico de cabras leiteiras (13), com a administração da monensina, relataram não ter ocorrido alteração dos valores de triglicerídeos pelo uso do ionóforo.

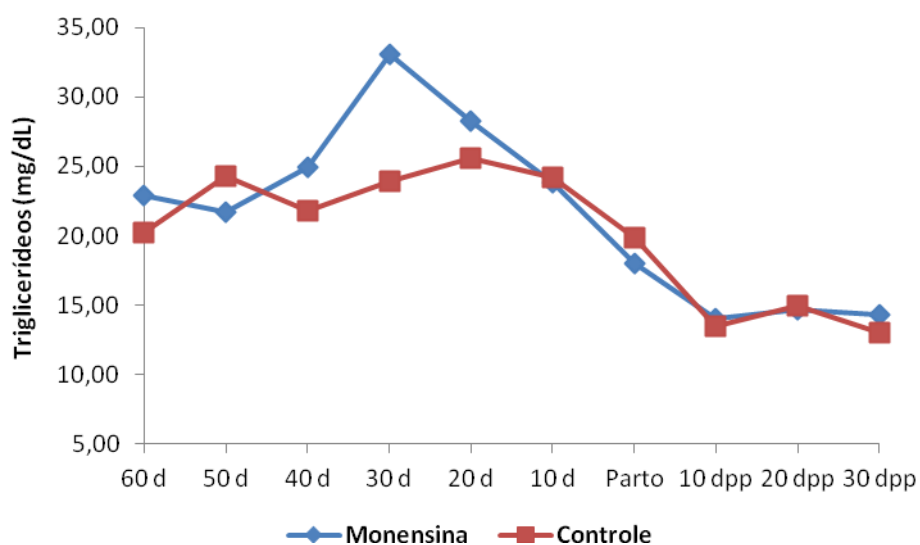


Figura 8. Valores médios dos triglicerídeos (mg/dL) das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle antes (dap), durante e após o parto (dpp).



Os resultados obtidos para os componentes do leite das ovelhas analisados no trabalho, se encontram dentro da faixa de normalidade para a espécie (27,28).

Com relação à concentração de gordura (%), diferenças significativas ( $P < 0,02$ ) existiram entre o parto ( $9,96\% \pm 3,23$ ) e os demais momentos do grupo controle (Figura 9). No grupo que recebeu a monensina, não houve diferenças entre os momentos ( $P > 0,05$ ). A comparação entre os grupos ao longo dos momentos evidenciou que não houve diferenças ( $P > 0,05$ ). O tratamento com a monensina sódica geralmente tem reduzido a produção de gordura no leite de vacas (29-33), embora, em alguns trabalhos, não tenham sido constatadas alterações na porcentagem (34,35). A redução na concentração da gordura no leite de cabras, tratadas com este ionóforo, foi relatada (13,36), e nos estudos de meta-análises, obtidos em vacas de leite (37). Este efeito da monensina sobre a concentração de gordura pode ser explicado pelo fato que dietas contendo este ionóforo aumentam o fluxo de propionato e reduzem a mobilização de ácidos graxos livres, tendendo a suprimir a produção de gordura no leite (38).

Tabela 2. Valores médios, respectivos desvios padrão ( $x \pm s$ ) e mediana da atividade sérica enzimática e creatinina das ovelhas suplementadas com monensina sódica (M) e do grupo controle (C), antes (dap), durante e após o parto (dpp).

Momentos Experimentais		Variáveis						
		AST (U/L)	FA (U/L)	GGT (U/L)	CK (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)
60 dap	M	83,06 <sup>aa</sup> ± 14,64	170,29 <sup>aa</sup> ± 53,89	52,46 <sup>aa</sup> ± 8,18	72,85 <sup>aca</sup> 48,57-91,07	0,84 <sup>aa</sup> ± 0,11	61,95 <sup>aa</sup> ± 14,11	22,88 <sup>ca</sup> ± 6,99
	C	95,15 <sup>ca</sup> ± 12,57	142,12 <sup>aa</sup> ± 42,30	48,45 <sup>aa</sup> ± 3,95	85,00 <sup>aa</sup> 48,57-97,14	0,89 <sup>aa</sup> ± 0,14	62,07 <sup>aa</sup> ± 9,51	20,19 <sup>aca</sup> ± 4,02
50 dap	M	84,56 <sup>aa</sup> ± 15,55	195,20 <sup>aa</sup> ± 56,34	56,83 <sup>aa</sup> ± 9,73	72,85 <sup>aa</sup> 72,85-72,85	0,85 <sup>aa</sup> ± 0,12	60,71 <sup>aa</sup> ± 12,90	21,71 <sup>aa</sup> ± 4,47
	C	92,54 <sup>aa</sup> ± 10,30	150,20 <sup>aa</sup> ± 42,78	48,45 <sup>aa</sup> ± 10,45	85,00 <sup>aa</sup> 48,57-97,14	0,96 <sup>aa</sup> ± 0,11	72,51 <sup>aa</sup> ± 16,49	24,27 <sup>ca</sup> ± 4,99
40 dap	M	85,31 <sup>aa</sup> ± 13,43	193,80 <sup>aa</sup> ± 46,47	55,74 <sup>aa</sup> ± 11,44	97,14 <sup>aca</sup> 78,92-115,3	0,87 <sup>aa</sup> ± 0,12	63,80 <sup>aa</sup> ± 10,78	24,91 <sup>ca</sup> ± 6,52
	C	95,16 <sup>ca</sup> ± 6,13	151,82 <sup>aa</sup> ± 45,73	52,28 <sup>aa</sup> ± 7,52	85,00 <sup>aa</sup> 72,85-121,4	0,95 <sup>aa</sup> ± 0,09	76,86 <sup>aa</sup> ± 14,17	21,81 <sup>ca</sup> ± 4,81
30 dap	M	84,56 <sup>aa</sup> ± 12,26	214,57 <sup>aa</sup> ± 58,25	55,74 <sup>aa</sup> ± 13,04	72,85 <sup>aca</sup> 54,64-91,07	0,88 <sup>aa</sup> ± 0,14	67,70 <sup>aa</sup> ± 10,10	33,07 <sup>bcA</sup> ± 11,49
	C	85,55 <sup>aa</sup> ± 12,25	143,73 <sup>ab</sup> ± 40,37	49,73 <sup>aa</sup> ± 9,36	97,14 <sup>aca</sup> 48,57-121,4	0,92 <sup>aa</sup> ± 0,07	74,27 <sup>aa</sup> ± 14,36	23,91 <sup>ca</sup> ± 6,75
20 dap	M	81,56 <sup>aa</sup> ± 9,50	170,27 <sup>aa</sup> ± 35,31	57,92 <sup>aa</sup> ± 13,87	72,85 <sup>aca</sup> 72,85-91,07	0,86 <sup>aa</sup> ± 0,09	68,51 <sup>aa</sup> ± 7,60	28,26 <sup>ca</sup> ± 6,35
	C	92,54 <sup>aa</sup> ± 12,25	143,75 <sup>aa</sup> ± 33,22	53,55 <sup>aa</sup> ± 6,84	72,85 <sup>aa</sup> 72,85-97,14	0,93 <sup>aa</sup> ± 0,12	75,57 <sup>aa</sup> ± 11,24	25,61 <sup>bcA</sup> ± 6,69
10 dap	M	78,57 <sup>aa</sup> ± 6,76	175,81 <sup>aa</sup> ± 55,77	62,29 <sup>aa</sup> ± 13,56	72,85 <sup>aa</sup> 48,57-72,85	0,84 <sup>aa</sup> ± 0,11	69,35 <sup>aa</sup> ± 12,25	23,87 <sup>ca</sup> ± 7,98
	C	91,66 <sup>aa</sup> ± 8,61	135,67 <sup>aa</sup> ± 45,86	53,55 <sup>aa</sup> ± 6,84	72,85 <sup>aa</sup> 72,85-72,85	0,92 <sup>aa</sup> ± 0,18	78,35 <sup>aa</sup> ± 14,91	24,23 <sup>ca</sup> ± 10,83
Parto	M	88,30 <sup>aa</sup> ± 14,96	178,60 <sup>aa</sup> ± 67,56	68,85 <sup>aa</sup> ± 15,30	145,7 <sup>bca</sup> 78,92-370,4	0,87 <sup>aa</sup> ± 0,13	64,34 <sup>aa</sup> ± 9,08	17,96 <sup>aca</sup> ± 4,29
	C	95,16 <sup>aa</sup> ± 11,20	134,07 <sup>aa</sup> ± 42,65	54,83 <sup>aa</sup> ± 8,94	170,00 <sup>ba</sup> 97,14-170	1,02 <sup>aa</sup> ± 0,18	72,38 <sup>aa</sup> ± 12,25	19,85 <sup>aca</sup> ± 14,88
10 dpp	M	91,29 <sup>aa</sup> ± 19,57	139,83 <sup>aa</sup> ± 18,42	74,31 <sup>ba</sup> ± 19,11	97,14 <sup>aca</sup> 72,85-97,14	0,75 <sup>aa</sup> ± 0,12	55,69 <sup>aa</sup> ± 6,39	14,07 <sup>aca</sup> ± 2,56
	C	119,61 <sup>bb</sup> ± 17,03	117,91 <sup>aa</sup> ± 32,09	67,58 <sup>ba</sup> ± 13,17	109,27 <sup>aca</sup> 72,85-170	0,77 <sup>aa</sup> ± 0,16	63,81 <sup>aa</sup> ± 11,03	13,49 <sup>aca</sup> ± 3,48
20 dpp	M	86,80 <sup>aa</sup> ± 13,46	146,74 <sup>aa</sup> ± 38,92	71,04 <sup>aa</sup> ± 18,59	72,85 <sup>aca</sup> 72,85-91,07	0,77 <sup>aa</sup> ± 0,15	63,93 <sup>aa</sup> ± 8,02	14,69 <sup>aca</sup> ± 2,32
	C	117,00 <sup>bcB</sup> ± 13,95	125,97 <sup>aa</sup> ± 48,64	62,48 <sup>aa</sup> ± 14,84	109,27 <sup>aca</sup> 72,85-145,7	0,77 <sup>aa</sup> ± 0,12	63,20 <sup>aa</sup> ± 14,24	14,99 <sup>aca</sup> ± 6,89
30 dpp	M	98,78 <sup>aa</sup> ± 18,51	163,34 <sup>aa</sup> ± 34,22	74,31 <sup>aa</sup> ± 16,36	97,14 <sup>aca</sup> 72,85-97,14	0,73 <sup>aa</sup> ± 0,14	69,16 <sup>aa</sup> ± 12,04	14,35 <sup>aca</sup> ± 2,58
	C	124,85 <sup>ba</sup> ± 17,34	124,36 <sup>aa</sup> ± 41,75	61,20 <sup>aa</sup> ± 15,30	109,27 72,85-194,3	0,74 <sup>aa</sup> ± 0,09	64,73 <sup>aa</sup> ± 14,08	13,01 <sup>aca</sup> ± 4,34

- Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre os momentos em cada grupo ( $P < 0,05$ ).

- Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre os grupos em cada momento ( $P < 0,05$ ).

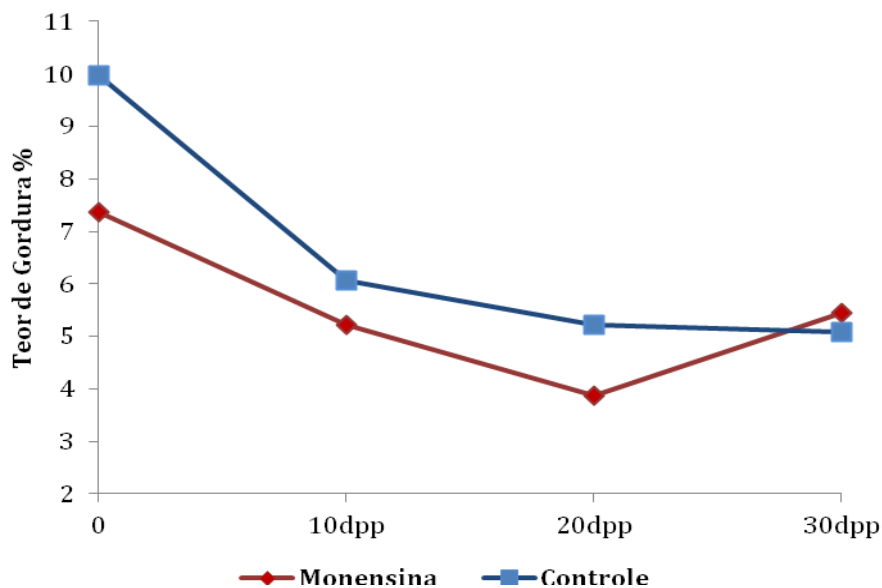


Figura 9. Valores médios da concentração da Gordura do leite (%), das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle após o parto (dpp).

A proteína no leite do grupo da monensina se apresentou mais elevada ( $P < 0,04$ ) no momento do parto (0h) ( $9,62 \text{ g/L} \pm 5,86$ ) em relação ao período de 30dpp ( $4,09 \text{ g/L} \pm 1,48$ ), enquanto para o grupo controle estas diferenças não ocorreram ( $P > 0,05$ ). Ao compararem-se os valores encontrados entre os grupos, ao longo dos momentos, foi constatado que não houve diferenças entre eles ( $P > 0,05$ ) (Figura 10). Os achados encontrados na literatura para este componente são bem heterogêneos. Os resultados foram semelhantes a outros trabalhos (30,34,38) e (35) em vacas de leite e em cabras de leite (13) suplementadas com monensina. Contudo, houve relato na elevação na concentração da proteína do leite em cabras de leite que receberam este ionóforo (36) e a justificativa para esta alteração está relacionada à ação deste composto em reduzir a degradação da proteína no rúmen, elevando a retenção de nitrogênio, e aumentando a disponibilidade de lisina, metionina e outros aminoácidos no intestino delgado (39). Entretanto, em outros, a ação da monensina provocou uma redução nos seus índices, que pode ser explicada como consequência do aumento na produção do leite, em vacas, resultante de um efeito diluidor (31,32,33,37,40).

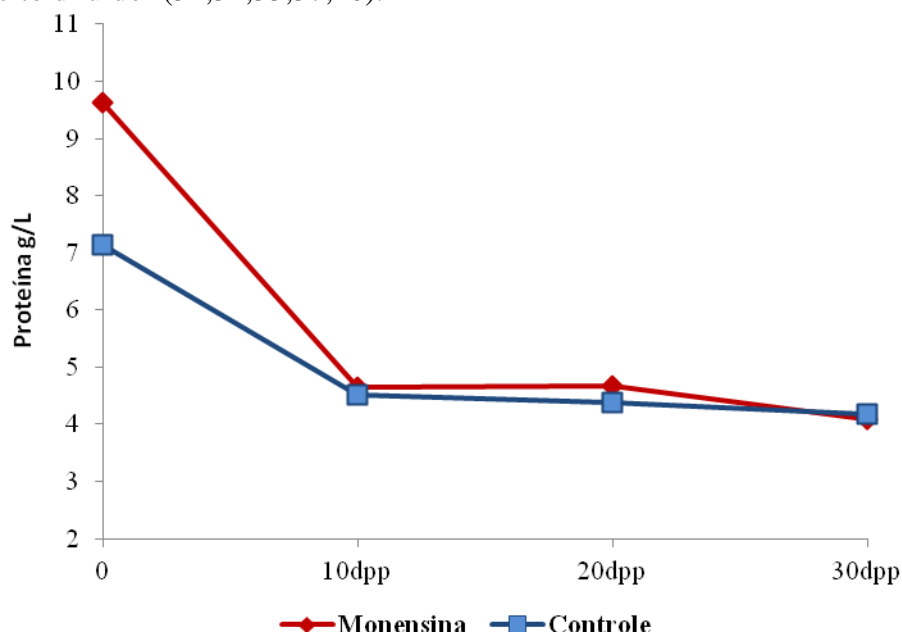


Figura 10. Valores médios da concentração da proteína do leite (g/L), das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle após o parto (dpp).

Quanto à concentração da lactose, pH e a acidez Dornic no leite das ovelhas, constatou-se não ter ocorrido efeito de momento e nem de grupo ( $P > 0,05$ ) (Figura 11 e 12). Para a lactose, os resultados se assemelham aos relatados por (13) e (36), em cabras leiteiras, e aos resultados de (32,37,38) em vacas de leite, que não encontraram diferenças ao suplementá-las com monensina na dieta. Com relação ao pH e a acidez Dornic, não se encontrou dados na literatura para que se pudesse realizar uma análise comparativa dos achados obtidos.

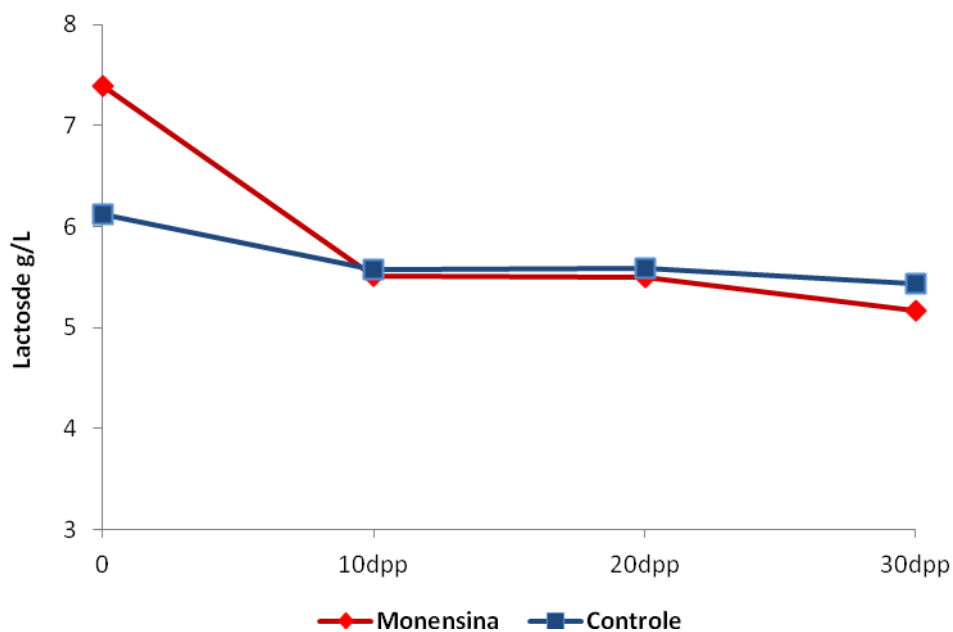


Figura 11. Valores médios da concentração da lactose do leite (g/L), das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle após o parto (dpp).

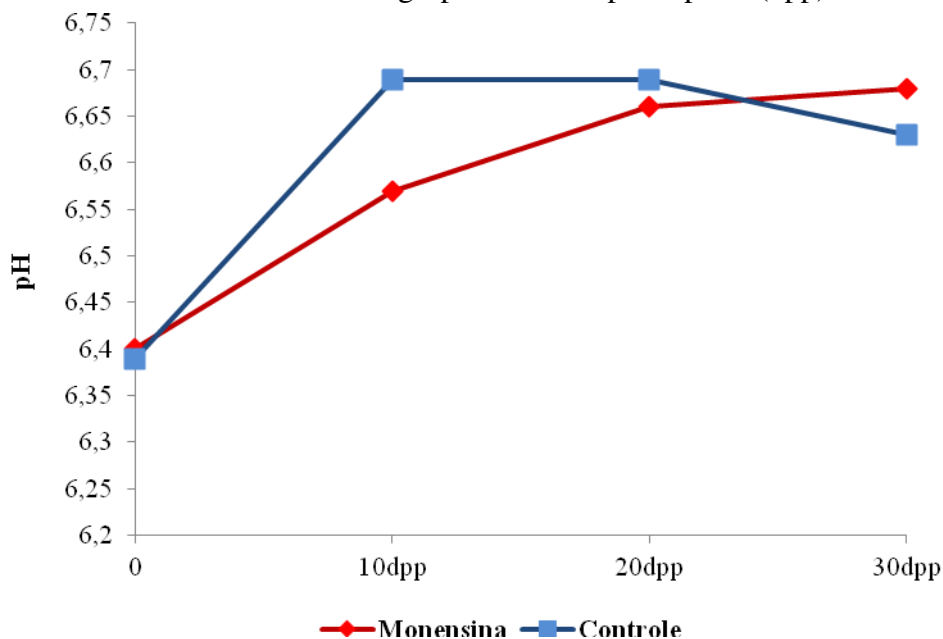


Figura 12. Valores médios do pH do leite (g/L), das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle após o parto (dpp).

Ao analisarem-se os dados obtidos nos grupos estudados, para o Extrato Seco Desengordurado (ESD), constatou-se que, no momento do parto, estes se mostraram mais elevados em relação aos demais períodos experimentais e que diferenças ocorreram ( $P < 0,003$ ) nos valores encontrados para o grupo da monensina com todos os outros, enquanto para o grupo controle esta ( $P < 0,032$ ) somente foi constatada aos 30 dpp (Figura 13). Quanto à comparação dos resultados entre grupos ao longo dos momentos, não foram verificadas diferenças ( $P > 0,05$ ). Não foram encontrados dados na literatura para uma análise comparativa dos achados do trabalho.

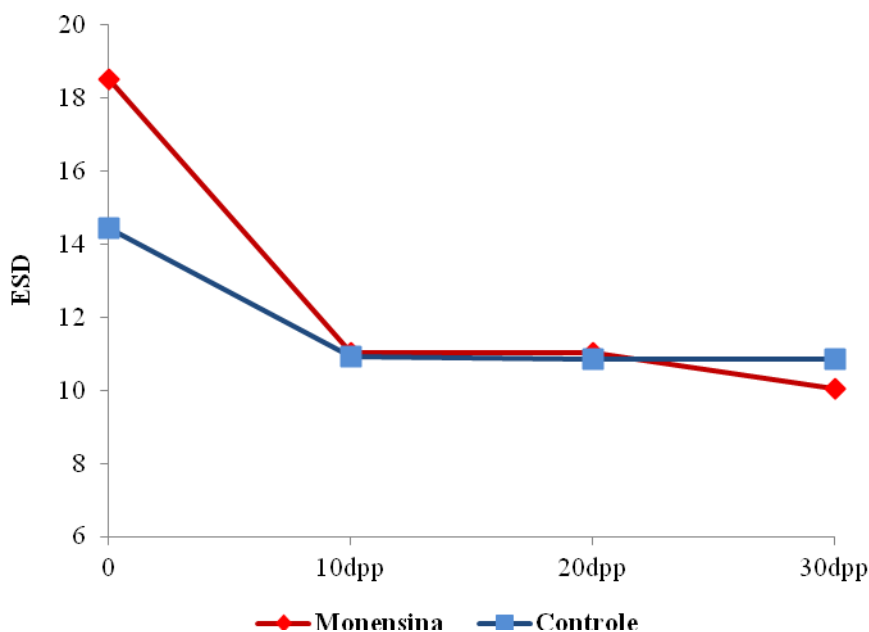


Figura 13. Valores médios do ESD do leite (%) das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle após o parto (dpp).

Os resultados obtidos para a densidade do leite demonstraram que, no grupo dos animais que receberam a monensina, ocorreram diferenças ( $P < 0,03$ ) entre os momentos do parto e 30 dpp, cujos valores obtidos foram de 1061,5 e 1048,6, respectivamente (Figura 14). No grupo controle, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) ao longo dos períodos de análise. Entre os grupos estudados, não foi constatada diferença ( $P > 0,05$ ). Em virtude da escassez de dados na literatura, não foi possível análise comparativa dos dados.

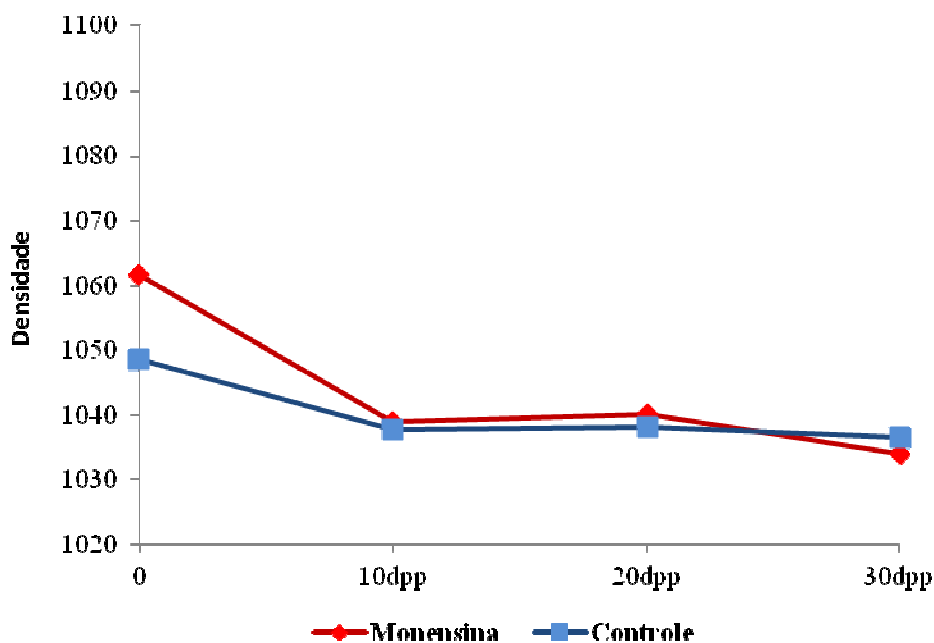


Figura 14. Valores médios da densidade do leite, das ovelhas suplementadas com monensina sódica e grupo controle após o parto (dpp).

## CONCLUSÕES

Apesar das discretas variações encontradas no perfil hematológico e de algumas enzimas e componentes do leite, a suplementação da monensina sódica, neste estudo, não influenciou para a obtenção de resultados mais expressivos em relação aos indicadores estudados.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de mestrado (IBPG nº0086-5.05/11), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (Edital Universal 14/2011, processo nº473104/2011-3), à CAPES (PROCAD NF – 2009/362-10) pelo apoio na formação de recursos humanos, e à Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns – UFRPE pela ajuda na realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Oliveira DR, Cardoso EC, Dourado AP, Brandão FZ, Ortolani EL, Minervino AHH, et al. Perfil metabólico de ovelhas da raça Santa Inês durante o período periparto na baixada litorânea do estado do Rio de Janeiro: proteína, energia e minerais. In: Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 2008; Gramado. Gramado; 2008.
2. Russel AJF. Nutrition of the pregnant ewe. In: Boden E. Sheep and goat practice. London: Baillière Tindall; 1991. p.29-39.
3. Caldeira RM, Belo AT, Santos CC, Vazques MI, Portugal AV. The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. Small Rumin Res. 2007;68:233-41.
4. Austin AR, Wilde RM. The effect of sodium monensin on pregnant ewes. Br Vet J. 1985;141:628-34.
5. Afonso JAB, Mendonça CL, Fioravante MCS, Kuchembuck MRG. Características e indicações clínicas dos ionóforos para ruminantes. Rev Cons Fed Med Vet. 2000;6:29-36.
6. Câmara A, Afonso JAB, Mendonça CL, Vieira ACS. Efeito da salinomicina na prevenção da acidose láctica ruminal experimental em ovinos. Cienc Anim Bras. 2013;14:65-73.
7. Diffay BC, Mckenzie D, Wolf C, Pugh DG. Abordagem e exame de ovinos e caprinos. In: Pugh DG. Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca; 2004. p.1-19.
8. Carvalho CCD. Indicadores preditivos para o diagnóstico da toxemia da prenhez em ovelhas [tese]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2013.
9. Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febinger; 1993.
10. Curi PR. Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas. Botucatu: Tipomic; 1997.
11. Reece WO. Dukes: fisiologia dos animais domésticos. 12a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

12. Taghipoor B, Seifi H, Mohri M, Farzaneh N, Naserian AA. Effect of prepartum administration of monensin on metabolism of pregnant ewes. *Livest Sci.* 2012;135:231-7.
13. Sadjadian R, Seifi HA, Mobri M, Naserian AA, Farzaneh N. Effect of monensin on metabolism and production in dairy Saanen goats in periparturient period. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2013;26:82-9.
14. Duffield TF, Sandals D, Leslie KE, Lissemore K, McBride BW, Lumsden JH, et al. Effect of prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on postpartum energy indicators in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 1998;81:2361-4.
15. Zahra LC, Duffield TF, Leslie KE, Overton TR, Putnam D, LeBlanc SJ. Effects of rumen-protected choline and monensin on milk production and metabolism of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 2006;89:4808-18.
16. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 6th ed. New York: Academic Press; 2008.
17. Araújo CASC. Estudo comparativo do perfil metabólico e hormonal de ovelhas com gestação única, gemelar e não gestantes alimentadas com dieta de alta densidade energética [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2009.
18. Braun JP, Trumel C, Bézille P. Clinical biochemistry in sheep: a selected review. *Small Rumin Res.* 2010;92:10-8.
19. Santos RA, Campos AGSS, Afonso JAB, Soares PC, Mendonça CL. Efeito da administração de propileno glicol e cobalto associado à vitamina B12 sobre o perfil metabólico e a atividade enzimática de ovelhas da raça Santa Inês no parto. *Pesqui Vet Bras.* 2012;32 Supl. 1:60-6.
20. Gürgöze SY, Zonturlu AK, Özyurtlu N, Içen H. Investigation of some biochemical parameters and mineral substance during pregnancy and postpartum period in Awassi ewes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2009;15:957-63.
21. Waziri MA, Ribadu AY, Sivachelvan N. Changes in the serum proteins, hematological and some serum biochemical profiles in the gestation period in the Sahel goats. *Vet Arhiv.* 2010;80:215-24.
22. Chiofalo V, D'aquino S, Scinardo Tenghi E, Sanzarello L, Chiofalo B, Piccitto F, et al. Effect of periparturient propylene glycol supplementation on some biochemical parameters in dairy goats. *Trop Subtrop Agroecosyst.* 2009;11:215-7.
23. Ribeiro LAO, Mattos RC, González FHD, Wald VB, Silva MA, LA Rosa VL. Perfil metabólico de ovelhas Border Leicester x Texel durante a gestação e a lactação. *Rev Port Cienc Vet.* 2004;99:155-9.
24. Duffield TF, LeBlanc S, Bagg R, Leslie K, Ten Hag J, Dick P. Effect of a monensin controlled release capsule on metabolic parameters in transition dairy cows. *J Dairy Sci.* 2003;86:1171-6.
25. Balikci E, Yildiz E, Gürdoğan F. Blood metabolite concentrations during pregnancy and postpartum in Akkaraman ewes. *Small Rumin Res.* 2007;67:247-51.

26. Mundim AV, Costa AS, Mundim SAP, Guimarães EC, Espindola FS. Influência da ordem e estágio da lactação no perfil bioquímico sanguíneo de cabras da raça Saanen. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2007;59:306-12.
27. Brito MA, Gonzalez FD, Ribeiro LA, Campos R, Lacerda L, Barbosa PR, et al. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e lactação. *Cienc Rural.* 2006;36:942-8.
28. Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin Res.* 2007;68:88-113.
29. Van Beukelen P, Van Lingen AFW, Wensing TH, Breuking HJ. Evaluation of methods to depress and restore milk fat levels in dairy cows with low milk syndrome. *Zbl Vet Med Assoc.* 1984;31:350-3.
30. Abe N, Lean IJ, Rabiee A, Porter J, Graham C. Effects of sodium monensin on reproductive performance of dairy cattle. II effects on metabolites in plasma, resumption of ovarian cyclicity and oestrus in lactating cows. *Aust Vet J.* 1994;71:277-81.
31. Van Der Werf JHJ, Jonker LJ, Oldenbroek JK. Effect of monensin on milk production by Holstein and Jersey cows. *J Dairy Sci.* 1988;81:427-33.
32. Phipps RH, Wilkinson JID, Jonker LJ, Tarrant M, Jones AK, Hodge A. Effect of monensin on milk production of Holstein-Friesian dairy cows. *J Dairy Sci.* 2000;83:2789-94.
33. Ruiz R, Albrecht GL, Tedeschi LO, Jarvis G, Russell JB, Fox DG. Effect of monensin on the performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows consuming fresh forage. *J Dairy Sci.* 2001;84:1717-27.
34. Lean IJ, Curtis M, Dyson R, Lowe B. Effects of sodium monensin on reproductive performance of dairy cattle. I effects on conception rates, calving to conception intervals, calving to heat and milk production in dairy cows. *Aust Vet J.* 1994;71:273-6.
35. Beckett S, Lean IJ, Dyson R, Tranter W, Wade L. Effect of monensin on the reproduction, health and milk production of dairy cows. *J Dairy Sci.* 1998;81:1563-73.
36. Brown DL, Hogue DE. Effects of feeding monensin sodium to lactating goats: milk composition and ruminal volatile fatty acids. *J Dairy Sci.* 1985;68:1141-7.
37. Duffield TF, Rabiee A, Lean IJ. Overview of meta-analysis of monensin in dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2012;28:107-19.
38. Sauer FD, Kramer JKG, Cantwell WJ. Antiketogenic effects of monensin in early lactation. *J Dairy Sci.* 1989;72:436-42.
39. Haimoud DA, Vernay M, Bayourthe C, Moncoulon R. Avoparcin and monensin effects on the digestion of nutrients in dairy cows fed a mixed diet. *Can J Anim Sci.* 1995;75:379-85.
40. Hayes DP, Pfeiffer DU, Williamson NB. Effect of intraruminal monensina capsules on reproductive performance and milk production of dairy cows fed pasture. *J Dairy Sci.* 1996;79:1000-6.

**Recebido em: 25/04/2014**

**Aceito em: 16/10/2015**

## Comitê de Avaliadores

Adelina Maria da Silva  
 Adriana Evangelista-Rodrigues  
 Ailton Vitor Pereira  
 Alan Maia Borges  
 Alessandro F. T. Amarante  
 Alexander Welker Biondo  
 Alexandre Oba  
 Alexandre Vaz Pires  
 Alice Maria Melville P. Della Libera  
 Alice Fernandes Alfieri  
 Alda Lúcia Gomes Monteiro  
 Altivo José de Castro  
 Alvimar José da Costa  
 Américo G. da Silva Sobrinho  
 Ana Carolina B. C. Fonseca Pinto  
 Ana Liz Garcia Alves  
 Ana Paula Frederico R. L. Bracarense  
 Ana Sílvia A. M. T. Moura  
 Ana Terezinha Tavechio  
 Andrey Pereira Lage  
 Andriago Barboza de Nardi  
 Annelise de Souza Traldi  
 Antonio Carlos Cunha Lacreata Júnior  
 Antônio Carlos Paes  
 Antonio João Scandolera  
 Antônio Sérgio Ferraudó  
 Antonio Waldir Cunha da Silva  
 Áureo Evangelista Santana  
 Bernardete Miranda dos Santos  
 Bruna P. A. da Fonseca  
 Bruno Watanabe Minto  
 Caris Maroni Nunes  
 Carla Forte Maiolino Molento  
 Carla Lopes de Mendonça  
 Carlos Augusto A. Valadão  
 Carlos Roberto Conti Naumann  
 Carolina Madeira Lucci  
 Cassiano Victória  
 Cecílio Soares Filho  
 Célia Regina Orlandelli Carrer  
 Celso A. Rodrigues  
 Cezinande de Meira  
 Ciniro Costa  
 Cláudia Valéria S. Brandão  
 Cláudio Dias Timm  
 Claudio Scapinello  
 Daisy Pontes Netto  
 Daniel Augusto Barroso Lessa  
 Delphim da Graça Macoris  
 Denise Botelho de O. Braga  
 Dilermando Miranda da Fonseca  
 Dirlei Antônio Berto  
 Domingos da Silva Leite  
 Edson Ramos de Siqueira  
 Eduardo Arruda T. Lanna  
 Eduardo Bagagli  
 Eduardo Francisquine Delgado  
 Eduardo Furtado Flores  
 Eduardo Harry Birgel Júnior  
 Eduardo Paulino da Costa

Edviges Maristela Pituco  
 Eliana Curvelo  
 Eliana Roxo  
 Eunice Oba  
 Evelise Oliveira Telles  
 Fabiano Montiani Ferreira  
 Felipe Masiero Salvani  
 Fernanda da Cruz L. e Alvarenga  
 Fernando Antônio de Avila  
 Fernando Ferreira  
 Fernando Pandolfo Bortolozzo  
 Flávia de Rezende Eugênio  
 Francisco Carlos Faria Lobato  
 Francisco Leydson Formiga Feitosa  
 Frederico Ozanam Papa  
 Geder Paulo Herrmann  
 Gilson Helio Toniollo  
 Gustavo Ferrer Carneiro  
 Helenice de Lima González  
 Helenice de Souza Spinosa  
 Humberto Tonhati  
 Iolanda Aparecida Nunes  
 Ivan Roque de Barros Filho  
 Ivo Wentz  
 Jackson Victor de Araújo  
 Jane Megid  
 Jean Carlos Ramos da Silva  
 Jean Guilherme F. Joaquim  
 Jener Alexandre S. Zuanon  
 João Carlos Pinheiro Ferreira  
 João Guilherme P. Filho  
 João Luiz Horácio Faccini  
 João Pessoa Araújo Júnior  
 João Ricardo Dittrich  
 José Antônio Viana  
 José Augusto B. Afonso  
 José Carlos de Andrade Moura  
 José Dantas Ribeiro Filho  
 José Domingos Guimarães  
 José Fernando Machado Menten  
 José Juradir Fagliari  
 José Laerte Nörnberg  
 José Nicolau Prospero Puoli Filho  
 José Paes de A. N. Pinto  
 José Paes de Oliveira Filho  
 José Roberto Kfoury Júnior  
 José Roberto Sartori  
 José Vasconcelos Lima Oliveira  
 Joselito Nunes Costa  
 Jovanir I. Müller Fernandes  
 Juliany Gomes Quitzan  
 Julieta Rodini Engrácia de Moraes  
 Júlio César de Freitas  
 Kátia Denise Saraiva Bresciani  
 Laerte Ferreira  
 Lara Borges Keid  
 Leandro Rodello  
 Lílian Gregory  
 Lisiane de A. Martins  
 Lissandro Gonçalves Conceição  
 Luciana Morganti Ferreira Maselli  
 Luciano José da Costa Figueiredo

Luís Carlos Vulcano  
 Luís Gustavo Corbellini  
 Luiz Alberto do Lago  
 Luiz Augusto do Amaral  
 Luiz Celso Hygino da Cruz  
 Luiz Ernani Henkes  
 Luiz Francisco Zafalon  
 Luiz Henrique de Araújo Machado  
 Magda Alves de Medeiros  
 Marcelo Beltrão Molento  
 Marcelo George Mungai Chacur  
 Marcelo Resende de Souza  
 Marcelo Vasconcelos Meireles  
 Márcia C. da Sena Oliveira  
 Márcia Marinho  
 Márcia Valéria Rizzo S. Szabó  
 Marcia Oliveira Lopes  
 Márcio Machado Ladeira  
 Marco A. F. Lopes  
 Marco Antonio Alvarenga  
 Marco Antonio Lemos de Oliveira  
 Marconi Rodrigues de Farias  
 Marcos Amaku  
 Marcos Chalhoulb Coelho Lima  
 Marcos Jun Watanabe  
 Marcos Veiga dos Santos  
 Margareth Elide Genovez  
 Maria Angélica Miglino  
 Maria Cecília Rui Luvizotto  
 Maria de Lourdes R. S. da Cunha  
 Maria Denise Lopes  
 Maria Jaqueline Manprim  
 Maria Lucia Gomes Lorenço  
 Maria Lúcia Zaidan Dagli  
 Maria Luiza Delavechia  
 Maria Madalena Pessoa Guerra  
 Maria Terezinha S. Peraçoli  
 Márcia Valéria Rizzo S. Szabó  
 Maria Verônica de Souza  
 Marflia Martins Melo  
 Mary Marcondes  
 Mauricio Costa Alves da Silva  
 Mayra Elena O. D'Avila  
 Assumpção  
 Milton Hissashi Yamamura  
 Mônica Vicky Bahr Arias  
 Nei Moreira  
 Nelson Carneiro Baião  
 Nelson Moraes  
 Nereu Carlos Preste  
 Nilson Roberto Benites  
 Noeme Sousa Rocha  
 Pacífico Antônio Diniz Belém  
 Paulo Alberto Lovatto  
 Paulo César Ciarlini  
 Paulo Fernando Machado  
 Paulo Francisco Domingues  
 Paulo Henrique Franceschini  
 Paulo Henrique Jorge da Cunha  
 Paulo Michel Roehe  
 Paulo Roberto Brandão  
 Paulo Roberto de Lima Meirelles  
 Paulo Roberto Rodrigues Ramos



Peterson Triches Dornbusch  
Priscilla Anne Melville  
Raimundo Souza Lopes  
Raphael Lúcio Andreatti Filho  
Raquel Y. A. Baccarim  
Raul Franzolin Neto  
Regina Kiomi Takahira  
Renato Cesar Sacchetto Tôres  
Renato Silva de Sousa  
Renée Laufer Amorim  
Ricardo Augusto Mendonça Vieira  
Ricardo de Oliveira Orsi  
Ricardo J. Del Carlo  
Roberta Lemos Freire  
Roberto Calderón Gonçalves  
Roberto de Oliveira Roça  
Roberto Sartori Filho  
Roberto Soares de Castro  
Rodrigo Martins Soares  
Rodrigo Otávio Silveira Silva  
Rogério de Paula Lana  
Rogério Giufrida  
Rogério Martins Amorim  
Ronaldo Lopes Oliveira  
Rosana M. O. Clark  
Rosângela Zacarias Machado  
Rosangela Locatelli Dittrich  
Rubens Antônio Carneiro  
Sandra de Moraes Gimenes Bosco  
Sandra Mara Araújo Crispim  
Sebastião de Campos Valadares Filho  
Sergio Borges Mano  
Sheila Canavese Rahal  
Sílvia M. Nishida  
Simone Baldini Lucheis  
Simone de Carvalho Balian  
Simone Tostes de Oliveira  
Sony Dimas Bicudo  
Stefano Hagen  
Stélio Pacca Loureiro Luna  
Tereza Cristina C. da Silva  
Tilde Rodrigues Froes  
Valéria Marçal Félix de Lima  
Valéria Nobre L. S. Oliva  
Vamilton Alvares Santarém  
Vanerli Beloti  
Vania Maria de V. Machado  
Venício José de Andrade  
Vera Lúcia M. Hall  
Victor Cruz Rodrigues  
Virgínia Bodelão Richini Pereira  
Wagner dos Reis  
Wagner Luis Ferreira  
William Koury Filho

## REVISTA “VETERINÁRIA E ZOOTECNIA”

## NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

## ARTIGOS CIENTÍFICOS

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

## 1. Página de rosto, com:

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

## 2. Página com resumo, abstract e resumen

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

## 3. A estrutura do artigo deverá conter:

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

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

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

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

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

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

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

## ARTIGOS DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, considerações finais e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

## RELATOS DE CASO

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

## COMUNICAÇÕES CURTAS

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

## REFERÊNCIAS E CITAÇÕES

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

### Exemplos

#### *Citações*

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

#### *Referências*

Indique até seis autores seguidos de et al.

## 1 Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

## 2 Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

## 3 Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

## 4 Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

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

## 5 Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

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

## 6 Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos

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

## 7 Publicações disponíveis na Internet

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

## JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE AND ANIMAL SCIENCE

### RULES FOR PRESENTATION OF PAPERS

The **Journal of Veterinary Medicine and Animal Science**, from School of Veterinary Medicine and Animal Science - UNESP, Botucatu, publishes original scientific and review papers, case reports and short communications related to Veterinary Medicine and Animal Science with semestral periodicity. The journal is open to national and/or foreign contributions (in English or Spanish) under the author's full responsibility.

Publication is conditioned to preliminary evaluation by the president of the editorial board, that analyses the merit and formal aspects of the work, according to the category of submitted paper and established editorial rules. If adequate, the article is subjected to review by two experts in the field. Opinion of reviewers are kept undisclosed. There are no possibility of identification of authors and reviewers. The articles not accepted will be returned to the authors.

Manuscripts must be submitted at the journal website <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>.

**Prof. Helio Langoni**

**Revista "Veterinária e Zootecnia"**

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

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

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

#### SCIENTIFIC PAPERS

Must be prepared according to the following items:

#### 1. Title page:

- Title of the manuscript in Portuguese, English and Spanish, using Times New Roman font 12, simple spacing, bold and centered, with the words in upper case. When necessary, indicate the financial support as first footnote;

- Full authors names, where only the first letter of each name must be in upper case at the right side of the page. The authors' names must be typed separated by line, with numbered superscript **footnotes, which will indicate** the position and author's professional address, followed by the name of the institution where the work was done or to where it is linked;

- Name, address, telephone number, fax and e-mail address for correspondence;

- In case of involvement of human or experimental animals include the Ethics Committee approval or equivalent, and type before the bibliographic references with date of approval.

#### 2. Abstract in Portuguese, English, and Spanish

- The "resumo", abstract and "resumen" must be followed by the title in the respective language and should not exceed 400 words each, with information regarding introduction, methods, results and conclusions. Text must be justified and in a single paragraph, simple spacing, beginning with the "RESUMO". Independent of the paper language, the abstract must be submitted in English, Portuguese and Spanish.

- Must include a maximum of five "palavras-chave", keywords, and palabras claves that identify the text content.

#### 3. The structure of the paper must include:

**Introduction:** Clearly state the objective of the study with brief overview of the investigated problem and literature review.

**Material and Methods:** Provide a concise description of the experimental methods, variables, population in study, equipment, as well as the statistics, in sufficient detail to allow other researches to reproduce the results.

**Results:** The results should be described without interpretation and comparisons. The results may include **tables**, which should come in a separate sheet (maximum of 5 tables) and numbered consecutively in Arabic numerals, with the title on the top, according to the rules of table presentation by ABNT/WBR 6023/2000 from Associação Brasileira de Normas Técnicas, and identified in the text as Table; **figures**, in case of graphs, photographs, drawings, maps, etc, numbered consecutively in Arabic numerals (maximum of six), cited in the text as Figure. **Photographs** may be black and white or color, identified with the author's name in the back. **Original drawings** must be printed in high quality paper.

**Discussion:** Should be the interpretation of the results, relative to other relevant studies, presented in the introduction. If convenient, the results and discussion may be presented together.

**Conclusions:** The final synthesis, based on the results and discussion.

**References:** Should be presented according to Vancouver rules (<http://www.icmje.org/>), and arranged in alphabetical order, by author's last name (examples in the end of the instructions).

Manuscripts **should** be edited in Microsoft Word for Windows, for text, Excel (any version) for graphs, JPEG or GIF format (images) for photographs, drawings and maps, A4 format paper (21,0 x 29,7 cm), double spaced, leaving at least 2,5 cm margins, (lateral, top and bottom of page), Times New Roman font, size 12 and numbered in Arabic numerals, beginning in the identification page. The authors will have to present numeration in the lines, restarting the counting to each new page. Illustrations and legends must be presented on separate sheets.

Reprints will not be offered. The articles will be available in PDF format at the journal website. The same rules apply for all the other sections of the journal. The manuscripts should not exceed 15 pages. Unusual abbreviations should be used only after first time citation.

## REVIEW ARTICLES

The review articles will be published in Portuguese, English or Spanish, if it provides scientific contribution that is relevant in the area, when invited by the editors. The review articles must include: Title (Portuguese, English and Spanish), resumo with palavras-chave, abstract with key words and resumen with palabras-claves, introduction, subject overview, conclusion e references. Must contain a maximum of 20 pages and 60 references.

## CASE REPORTS

Should not be prepared with the same structure as the articles. The case reports must present the title in Portuguese, English and Spanish, resumo with palavras-chave, abstract with keywords and resumen with palabras claves and references. Must contain a maximum of five pages, three tables or figures and 15 references.

## SHORT COMMUNICATIONS

These are reports with new and relevant data of original studies, as preliminary results of a research. Must be presented with a maximum of five pages, one table and ten references. The structure should follow the same rules for case reports.

## REFERENCES AND CITATIONS

References should be numbered consecutively in order in which they are first mentioned in the text, tables, and legends by Arabic numbers in parentheses in same sequence. The titles of journals should be abbreviated according to the style *List of Journals Indexed in Index Medicus* available from: <http://www.nlm.nih.gov>.

### Examples:

#### *Citations*

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram. O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51). O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

### References

List the first six authors followed by et al.

#### 1 Journal article

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

#### 2 Organization as author

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

#### 3 Book

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

#### 4 Chapter in a book

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

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

#### 5 Conference paper

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

#### 6 Dissertation

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

#### 7 Electronic material on Internet

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

## REVISTA “VETERINARIA Y ZOOTECNIA”

### NORMAS PARA PRESENTACIÓN DE TRABAJOS

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

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

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

**Prof. Helio Langoni**

**Revista “Veterinaria y Zootecnia”**

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

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

### INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

#### ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Deben ser estructurados de acuerdo con los siguientes puntos:

**1. Página principal, con:**

- Título del trabajo en portugués, inglés y en español, tipo de letra Times New Roman, número 12, con espacio entre líneas sencillo, en negrilla y centrado, en letra mayúscula. Cuando sea necesario, indicar la entidad que financia la investigación, como primer pié de página;
- Nombres completos de los autores, en los cuales solamente la primera letra de cada nombre debe ser mayúscula, en lado derecho de la página. Digitalarlos separados un por línea, con **notas de pié** de página numeradas y en sobrescrito, **que indicarán** el cargo y la dirección profesional de los autores, seguidos de la institución donde el trabajo fue realizado o en las cuales están vinculados;
- Nombre, dirección, teléfono, fax y correo electrónico para correspondencia.
- En el caso de involucrar seres humanos o animales de experimentación, enviar el concepto de la Comisión de Ética o equivalente, destacando en el trabajo antes de las referencias y fecha de aprobación, así como el envío de la copia del concepto.

**2. Página con resumen en Portugués, Inglés y Español.**

- Tanto el “resumo”, como el “abstract”, así como el resumen, deben estar seguidos del título del trabajo, en el idioma respectivo y contener, como máximo 400 palabras cada uno, con informaciones referentes a la introducción, metodología, resultados y conclusiones. El texto debe estar ajustado (justificado) y digitado en un solo párrafo y con espacio entre líneas sencillo iniciando por el “RESUMO”. El “Abstract”, y el Resumen, deben ser fiel traducción del “Resumo”. Independiente da la lengua que el artículo fue presentado deberá contener el resumen en portugués, inglés y español.

- Deben contener como máximo, cinco “palavras-chave” “keywords”, y palabras clave que identifiquen el contenido del texto.



### 3. La estructura del artículo deberá contener:

**Introducción:** debe ser clara, objetiva y relacionada al problema investigado, y a la literatura pertinente, así como con los objetivos de la investigación. La introducción establece los objetivos del trabajo.

**Materiales y Métodos:** debe ofrecer informaciones de reproductibilidad de la investigación, de forma clara y concisa, como variables, población, muestra, equipos, o métodos utilizados, inclusive los estadísticos.

**Resultados:** Presentación de los resultados obtenidos, que deben ser descritos, sin interpretaciones y comparaciones. Podrá ser bajo la **forma de tablas**, en hojas separadas, con máximo de cinco, ordenadas en algarismos arábigos, y encabezadas por el título, de acuerdo con las normas de presentación tabular de las normas ABNT/WBR 6023/2000 de la Asociación Brasileña de Normas Técnicas, ABNT, identificadas en el texto como Tabla; bajo la **forma de figuras** en los casos de gráficos, fotografías, dibujos, mapas, etc., ordenadas en algarismos arábigos hasta un máximo de seis, y citadas en el texto como Figura. **Fotografías** pueden ser en blanco y negro o a colores; identificadas con el nombre del autor o autores al lado opuesto. En el caso de **dibujos originales**, la impresión debe ser en papel adecuado, de calidad.

**Discusión:** Debe ser entendida como la interpretación de los resultados, confrontando la literatura pertinente, descrita en la introducción. De ser conveniente los resultados y discusión podrán ser presentados conjuntamente.

**Conclusiones:** Es la síntesis final, fundamentada en los resultados y en la discusión.

**Referencias:** Deben ser presentadas de acuerdo con las normas de Vancouver (<http://www.icmje.org/>), y el arreglo organización debe ser en orden alfabético por apellido del autor (modelos anexos al final).

**Deberán** ser editados en Microsoft Word for Windows, para edición de textos, Excel (cualquier versión) para gráficos, formato JPEG o GIF (imagen) para fotografías, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), a doble espacio, manteniendo márgenes de 2,5 cm, en las laterales, parte superior e inferior de cada página, fuente Times New Roman, número 12 y numeración consecutiva de las páginas en números arábigos, a partir de la hoja de identificación. Deberán presentar también la numeración en las líneas, recomenzando la cuenta a cada página nueva. Ilustraciones y leyendas deben ser presentadas en hojas separadas.

No se ofrecerán separatas. Los artículos estarán disponibles en el formato PDF en la página WEB de la revista. Para las demás secciones de la revista son válidas las normas anteriores. No deben exceder las 15 páginas. Abreviaturas no usuales, deben ser empleadas después de haber sido escritas por extenso en la primera utilización.

## ARTÍCULOS DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los artículos de la revisión bibliográfica serán publicados en los idiomas portugués, inglés y español, cuando el autor presente contribución científica, importante en el área específica del asunto abordado, y por invitación de los editores.

Deberán contener: Título (portugués, inglés y español), resumen con palavras-chave, abstract con keywords e resumen con palabras claves, introducción, desarrollo del tema, conclusión y referencias. Deberán contener como máximo 20 páginas y 60 referencias (citas bibliográficas).

## ESTUDIOS DE CASO

No deben ser subdivididos, como para los artículos. Deben presentar el título en portugués, en inglés y español, resumen con palavras-chave, abstract con key words e resumen con palabras-claves y referencias. Deben contener como máximo cinco páginas, tres tablas o figuras y 15 referencias bibliográficas.

## COMUNICACIONES CORTAS

Son relatos con datos inéditos y relevantes de estudios originales, como por ejemplo resultados preliminares de una investigación. Deben ser presentados como máximo en cinco páginas, una tabla y 10 referencias bibliográficas. La estructuración debe respetar las normas para estudios de caso.

## REFERENCIAS E CITACIONES

Numerar las referencias consecutivamente según el orden en que se mencionen por primera vez en el texto. En éste, en los cuadros y leyendas, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Abreviar los títulos de las revistas según *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponible en: <http://www.nlm.nih.gov>.

### Ejemplos

#### *Citations*

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

#### *Referencias*

Mencionan los seis primeros autores seguidos de la abreviatura et al.

### 1 Artículo de periódico

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

### 2 Organización como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

### 3 Libro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

### 4 Capítulo en libro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

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

**5 Ponencias o conferencias en simposio, congreso, reuniones, etc .**

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

**6 Tesis**

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

**7 Medios electrónicos en Internet**

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