

Veterinária e Zootecnia

Vet e Zootec.

2015 setembro; 22(3): 314-492

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

ISSN Impresso 0102-5716

ISSN Eletrônico 2178-3764

Botucatu - SP – Brasil

Veterinária e Zootecnia

ISSN Impresso 0102-5716
ISSN Eletrônico 2178-3764

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

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

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

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

Trimestral
Texto em português/inglês/espanhol
Descrição baseada em: Vol. 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^a. Dr^a. Marilza Vieira Cunha Rudge

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof^a Dr^a 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^a Dr^a 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^a Dr^a 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 (UFES/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	321
ARTIGOS DE REVISÃO/REVIEW ARTICLES/ARTÍCULOS DE REVISIÓN	
QUEIMADURAS TÉRMICAS EM CÃES E GATOS/ THERMAL BURNS IN DOGS AND CATS / QUEMADURAS TÉRMICAS EN PERROS Y GATOS. Vinicius Gonzalez Peres Albernaz, Ariele Aparecida Ferreira, Jorge Luiz Costa Castro	322
FATORES ENVOLVIDOS NOS MECANISMOS DE ABERTURA CERVICAL EM CADELAS COM PIOMETRA/ FACTORS INVOLVED IN OPENING CERVICAL MECHANISMS IN BITCHES WITH PYOMETRA/ FACTORES QUE INTERVIENEN EN LOS MECANISMOS DE APERTURA CERVICAL EN PERRAS CON PIOMETRA. Rodrigo Volpato, Maria Denise Lopes	335
PERSPECTIVAS DO USO DE MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE EQUINOS DE CORRIDA DA RAÇA QUARTO DE MILHA/ PROSPECTS OF THE USE OF MOLECULAR MARKERS IN THE GENETIC BREEDING OF RACING QUARTER HORSES/ PERSPECTIVA DEL USO DE MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE EQUINOS DE CARRERAS DE LA RAZA CUARTO DE MILLA. Guilherme Luis Pereira, Inaê Cristina Regatieri, Guilherme de Camargo Ferraz, Antonio de Queiroz Neto, Rogério Abdallah Curi	347
RELATOS DE CASO/CASE REPORTS/ESTUDIOS DE CASO	
INFESTAÇÃO POR <i>Ornithonyssus</i> spp. EM UM CRIATÓRIO DE PERIQUITOS AUSTRALIANOS/ INFESTATION BY <i>Ornithonyssus</i> spp. IN A AUSTRALIAN BUDGERIGARS BREEDING PLACE / INFESTACIÓN POR <i>Ornithonyssus</i> spp. EN UN CRIADERO DE PERIQUITOS AUSTRALIANOS. Danieli Brolo Martins, Joyce Rodrigues Lobo, Laura Garcia Vila, Jorge Stumpfs Diaz	370
SLAFRAMINE INTOXICATION IN HORSE IN SANTA CATARINA STATE / INTOXICAÇÃO POR ESCLAFRAMINA EM EQUINO NO ESTADO DE SANTA CATARINA / INTOXICACIÓN POR ESCLAFRAMINA EN EQUINO EN LA PROVINCIA DE SANTA CATARINA. Joandes Henrique Fontequê, Anderson Fernando Souza, Jackson Schade, Thiago Rinaldi Muller, Nádia Cristine Weinert	375
MASTITE NECROSANTE EM CADELA: RELATO DE CASO/ NECROTIZING MASTITIS IN A BITCH: CASE REPORT/ MASTITIS NECROTIZANTE EN PERRA: RELATO DEL CASO. Sidnei Nunes de Oliveira, Fabíola Soares Zahn, Felipe Morales Dalanezi, Endrigo Adonis Braga de Araujo, Luis Fernando Mercês Chaves Silva, Nereu Carlos Prestes.....	380
DEMODICOSE GENERALIZADA ADULTA E JUVENIL: RELATO DE DOIS CASOS/ WIDESPREAD DEMODICOSIS ADULT AND JUVENILE: TWO CASES REPORT / DEMODICOSIS GENERALIZADA ADULTA Y JUVENIL: DOS CASOS DE INFORME. Suyane Nayara Garcia Socoloski, Mayara da Cruz Burema, Bianca Garay Monteiro, Ana Maria Dalla Vecchia, Carolina Zorzo, Elaine Cristina Pereira de Almeida, Alinne Pinhal Braga, Thaís Badini Vieira.....	386

COMUNICAÇÃO CURTA/SHORT COMMUNICATION/COMUNICACIÓN CURTA

PREVALÊNCIA SOROLÓGICA DE *Leptospira* spp. EM BOVINOS LEITEIROS NA MICRORREGIÃO DE FRANCISCO BELTRÃO/ SURVEY OF SEROPREVALENCE OF *Leptospiras* pp. IN HOLSTEIN COWS IN THE MICROREGION OF FRANCISCO BELTRÃO / PREVALENCIA SEROLÓGICA DE *Leptospira* spp. EN BOVINOS LECHEROS EN LA MICRORREGIÓN DE FRANCISCO BELTRÃO. Mateus Peiter, José Francisco Xavier da Rocha, Felipe Lamberti Pivoto, Adelina Rodrigues Aires, Ricardo Xavier Da Rocha, José Francisco Manta Bragança, Abílio Galvão Trindade Ferreira, Marta Lizandra Do Rêgo Leal..... 392

LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DE *Neospora caninum* EM VACAS DA RAÇA HOLANDESA DA MICRORREGIÃO DE FRANCISCO BELTRÃO / SEROLOGICAL SURVEY OF *Neospora caninum* IN HOLSTEIN COWS IN THE FRANCISCO BELTRÃO REGION OF PARANÁ, BRAZIL / EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE *Neospora caninum* EN VACAS DE LA RAZA HOLSTEIN EN LA MICROREGIÓN DE FRANCISCO BELTRÁN, PARANÁ, BRASIL. José Xavier Rocha, Felipe Lamberti Pivoto, Adelina Rodrigues Aires, Ricardo Xavier da Rocha, Abílio Galvão Trindade Ferreira, Marta Lizandra do Rego Leal 396

ARTIGOS/ARTICLES/ARTÍCULOS

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA, ELETROCARDIOGRÁFICA E DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA EM GATOS NO PERÍODO PEDIÁTRICO/ RADIOGRAPHIC, ELECTROCARDIOGRAPHIC AND SYSTEMIC BLOOD PRESSURE EVALUATION IN CATS DURING THE PEDIATRIC PERIOD/ EVALUACIÓN RADIOGRÁFICA, ELECTROCARDIOGRÁFICA Y PRESIÓN ARTERIAL SISTÊMICA EN LOS GATOS DURANTE EL PERIODO DE PEDIATRÍA. Úrsula Chaves Guberman, Karina Preising Aptekmann, Pollyanna Zampirolli Costa, Daniel Capucho Oliveira, Daniel Cometti Borlini, Fabiano Séllos Costa 400

OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM FELINOS DE RECIFE, PE, BRASIL/ OCCURRENCE OF *Cryptosporidium* spp. IN FELINE FROM RECIFE, PERNAMBUCO STATE, BRAZIL/ OCURRENCIA DE *Cryptosporidium* spp. EN FELINO DE RECIFE, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL. Giselle Ramos da Silva, Ivanise Maria de Santana, Ana Carolina Messias de Souza Ferreira, João Carlos Gomes Borges, Leucio Câmara Alves, Maria Aparecida da Gloria Faustino..... 408

PERFIL BIOQUÍMICO, HORMONAL E MINERAL DE VACAS NO MOMENTO DO PARTO NORMAL E COM DISTOCIA/ BIOCHEMICAL PROFILE, HORMONE AND MINERAL OF COWS AT THE TIME OF ELIVERY AND NORMAL WITH DYSTOCIA/ PERFIL BIOQUÍMICO, HORMONAL Y MINERALES DE VACAS EN EL MOMENTO DEL PARTO NORMAL Y CON DISTOCIA. Alonso Pereira Silva Filho, José Augusto Bastos Afonso, Cleyton Charles Dantas Carvalho, Janaina Azevedo Guimarães, Nivaldo Azevêdo Costa, Carla Lopes Mendonça..... 418

PESQUISA DE ANTICORPOS E DNA DE *Leptospira* spp. EM SORO CANINO / ANTIBODIES AND DNA DETECTION OF *Leptospira* spp. IN CANINE SERUM/ DETECCIÓN DE ANTICUERPOS Y ADN DE *Leptospira* spp. EN SUERO CANINO. Helio Langoni, Maíra Claudio de Ponte, Daniela Barbosa, Marcela de Pinho Manzi, Rodrigo Costa da Silva, Benedito Donizete Menozzi 429

MONITORAMENTO DA AQUISIÇÃO DE IMUNIDADE PASSIVA EM CORDEIROS COM INGESTÃO VOLUNTÁRIA DE COLOSTRO PELA DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL SÉRICA/ MONITORING OF ACQUISITION OF PASSIVE IMMUNITY IN LAMBS WITH VOLUNTARY COLOSTRUM INTAKE BY DETERMINING THE SERUM TOTAL PROTEIN/ MONITOREO DE LA ADQUISICIÓN DE LA INMUNIDAD PASIVA EN CORDEROS CON LA INGESTION VOLUNTARIA DEL CALOSTRO POR LA DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA SÉRICA TOTAL. Luana de Cássia Bicudo, Raimundo Souza Lopes, Regina Kioni Takahira, Leandro Rodello, Sony Dimas Bicudo..... 437

- CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E VIABILIDADE CELULAR EM CABRAS COM MASTITE SUBCLÍNICA POR STAPHYLOCOCCUS SPP./ SOMATIC CELL COUNT AND CELL VIABILITY IN GOATS WITH SUBCLINICAL MASTITIS BY STAPHYLOCOCCUS SPP. / CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS Y LA VIABILIDAD CELULAR EN CABRAS CON MASTITIS SUBCLÍNICA POR STAPHYLOCOCCUS SPP.** Sandra Renata Sampaio Salaberry, André Becker Simões Saidenberg, Eveline Zuniga, Fernanda Fidelis Gonsales, Priscilla Anne Melville, Nilson Roberti Benites445
- AVALIAÇÃO DE TRATAMENTO HOMEOPÁTICO NA MASTITE OVINA SUBCLÍNICA/ EVALUATION OF HOMEOPATHIC TREATMENT IN OVINE SUBCLINICAL MASTITIS/ EVALUACIÓN DE TRATAMIENTO HOMEOPÁTICO EN LA MASTITIS OVINA SUBCLÍNICA.** Roberto Mangieri Junior, Nilson Roberti Benites, Priscilla Anne Melville455
- ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Leptospira* spp. EM GATOS/ SEROLOGICAL STUDY OF LEPTOSPIRA SPP. INFECTION IN CATS/ ESTUDIO SEROLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR LEPTOSPIRA SPP. EN GATOS.** Joyce Cappa Mittestainer, Alessandra Melchert, José Francisco Antunes Ribeiro, Raissa Saran Sartori, Samea Fernandes Joaquim, Katia Bresciani, Helio Langoni465
- GONADOTROPIN RELEASING HORMONE (GnRH) AND EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN (ECG) IMPROVE THE PREGNANCY RATE ON PROTOCOLS FOR TIMED-ARTIFICIAL INSEMINATION IN BEEF CATTLE/ O FATOR LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (GnRH) E A GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG) MELHORA A TAXA DE PREENHEZ EM PROTOCOLOS PARA A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BOVINOS DE CORTE/ EL FACTOR LIBERADOR DE GONADOTROPINA (GNRH) Y LA GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (ECG) MEJORA DE LA TASA DE EMBARAZO EN PROTOCOLOS PARA LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EM TIEMPO FIJO EN GANADO DE CARNE.** Anelise Francisco Romano Gaievski, Graham Cliff Lamb, Romildo Romualdo Weiss, Melina Andreia Formighieri Bertol, Marcio Saporski Segui, Ana Claudia Machinski Rangel Abreu, Luiz Ernandes Kozicki471

EDITORIAL

IMPACTO OU FATOR DE IMPACTO DAS REVISTAS CIENTÍFICAS?

O fator de impacto de uma revista é obtido a partir do Journal Citation Reports (JCR). É uma publicação anual do Instituto de Informação Científica, uma divisão da Thomson Reuters. Ela fornece informações sobre revistas acadêmicas e foi publicada originalmente como parte do Science Citation Index, e é elaborada a partir das citações feitas pelos autores em um determinado ano. O tema tem sido discutido amplamente, pois agências de fomento e a CAPES utilizam essa métrica para avaliação da produção científica, fato de ocorrência mundial. O primeiro passo para que uma revista tenha um “fator de impacto JCR” é estar incluída no Web of Science.

A medida do impacto de uma revista científica se deve a Eugene Garfield que, em 1955, estabeleceu como um critério de classificação no Science Citation Index (SCI), que expandiu-se como indicador do mérito científico, tanto das revistas como de seus autores. Apesar desses conceitos, tem se especulado que a comunidade científica não deve confiar exclusivamente no fator de impacto das revistas, mas também no impacto do artigo para os seus leitores, que foi sempre o foco da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos. O importante é buscar a excelência da produção científica e publicar de acordo com os interesses dos seus autores, visando a abrangência do público que se quer atingir.

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: Queimaduras térmicas em cães e gatos; Fatores envolvidos nos mecanismos de abertura cervical em cadelas com piometra; Perspectivas do uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de equinos de corrida da raça quarto de milha. Os relatos de caso: Infestação por *Ornithonyssus* spp. em um criatório de periquitos australianos; Slaframine intoxication in horse in santa catarina state; Mastite necrosante em cadela: relato de caso; Demodicose generalizada adulta e juvenil: relato de dois casos . Comunicações curtas: Prevalência sorológica de *Leptospira* spp. em bovinos leiteiros na microrregião de Francisco Beltrão; Levantamento sorológico de *Neospora caninum* em vacas da raça holandesa da microrregião de Francisco Beltrão. Os artigos originais: Avaliação radiográfica, eletrocardiográfica e da pressão arterial sistêmica em gatos no período pediátrico; Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em felinos de Recife, PE, Brasil; Perfil bioquímico, hormonal e mineral de vacas no momento do parto normal e com distocia; Pesquisa de anticorpos e DNA de *Leptospira* spp. em soro canino; Monitoramento da aquisição de imunidade passiva em cordeiros com ingestão voluntária de colostro pela determinação da proteína total sérica; Contagem de células somáticas e viabilidade celular em cabras com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp.; Avaliação de tratamento homeopático na mastite ovina subclínica; Estudo soroepidemiológico da infecção por *Leptospira* spp. em gatos; Gonadotropin releasing hormone (GnRH) and equine chorionic gonadotropin (ECG) improve the pregnancy rate on protocols for timed-artificial insemination in beef cattle

Prof. Helio Langoni
Editor-Chefe

QUEIMADURAS TÉRMICAS EM CÃES E GATOS

Vinicius Gonzalez Peres Albernaz¹
Ariete Aparecida Ferreira²
Jorge Luiz Costa Castro³

RESUMO

Queimaduras ocorrem quando tecido vivo entra em contato por um longo período com um objeto ou substância aquecida. São descritas diversas zonas de acometimento, variando conforme o potencial de reversão da lesão, sendo elas a zona de coagulação, estase e hiperemia. Em relação à profundidade da lesão, estas podem ser graduadas conforme a espessura em superficial, parcial superficial, parcial profunda e total. A extensão de pele acometida pode ser calculada com base na “regra dos nove”, que determina que cada parte do corpo corresponde a um múltiplo de 9% do total da superfície corpórea. Apesar de raro nos pacientes veterinários, queimaduras graves podem levar ao choque por diminuição do fluxo sanguíneo periférico. Deve-se realizar como terapia tópica inicial a tricotomia ampla seguida da aplicação de solução salina gelada, lavagem com solução isotônica estéril, debridamento, aplicação de pomada antimicrobiana como sulfadiazina de prata e a cobertura com bandagens úmidas não aderentes. O debridamento de tecido desvitalizado deve ser realizado o mais precocemente possível e preferencialmente de forma agressiva. Na impossibilidade de realização da intervenção cirúrgica, pode-se realizar o debridamento conservativo com agentes enzimáticos, imersão em água e a aplicação de bandagens úmida-úmida. Após a formação do leito vascular livre de tecido necrótico e infectado, as queimaduras extensas podem ser fechadas por meio de retalhos, enxertos cutâneos, técnicas de avanço de pele ou ainda tratadas como ferida aberta até que o tratamento cirúrgico seja possível. Como complicações, podem ocorrer infecção, cicatrização excessiva e contratura da ferida, especialmente quando não há tratamento precoce. O resultado cosmético final normalmente é satisfatório quando há intervenção cirúrgica e recobrimento piloso completo. Apesar de raras em medicina veterinária, queimaduras severas são desafiadoras e diferentemente das feridas cutâneas traumáticas apresentam características e terapêuticas diferenciadas. A abundante literatura presente até a atualidade é predominantemente humana, sendo necessários mais estudos veterinários nesta área.

Palavras-chave: lesão térmica, sulfadiazina de prata, debridamento, canino, felino.

THERMAL BURNS IN DOGS AND CATS

ABSTRACT

Burns occur when living tissues are in contact for a long period with a heated object or substance. Various zones of involvement are described, ranging as the reversal potential of the lesion, they are the zone of coagulation, stasis and hyperemia. Regarding the depth of the lesion, they can be graded according to the thickness, as superficial,

¹ Médico Veterinário Residente Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Contato principal para correspondência.

² Médica Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

³ Docente de Técnica Cirúrgica, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

superficial partial-thickness, deep partial-thickness and full-thickness. The extent of affected skin can be calculated based on the "Rule of Nines", which states that each part of the body corresponds to a multiple of 9% of the total body surface. Although rare in veterinary patients, severe burns can lead to shock by decreasing of peripheral blood flow. Wide hair removal, followed by application of cold saline solution, lavage with sterile isotonic solution, debridement, application of antimicrobial ointment as silver sulfadiazine and cover with moist nonadherent dress must be performed as the initial topical therapy. The debridement of devitalized tissue should be performed as early as possible and preferably aggressively. The impossibility to performing the surgery, conservative debridement can be done with enzymatic agents, immersion in water and the application of wet-wet dress. After formation of a vascular bed free of necrotic and infected tissue, extensive burns can be closed by flaps, skin grafting techniques, skin advance techniques or treated as an open wound until surgical treatment can be possible. Complications as infection, excessive scarring and wound contracture can occur, especially when there is not early treatment. The final cosmetic result is usually satisfactory when there is surgical intervention and complete hair covering. Although rare in veterinary medicine, severe burns are challenging and unlike traumatic wounds, presents different features and therapeutic. The abundant literature nowadays is mostly human and more veterinary studies are necessary in this area.

Keywords: burn injury, silver sulfadiazine, debridement, canine, feline.

QUEMADURAS TÉRMICAS EN PERROS Y GATOS

RESUMEN

Las quemaduras se producen cuando el tejido vivo está en contacto durante un largo periodo con un objeto o sustancia caliente. Se describen varias áreas de participación, que varían de acuerdo con el potencial de reversión de la lesión, como la zona de coagulación, estasis e hiperemia. Con respecto a la profundidad de la lesión, pueden ser clasificadas de acuerdo a el espesor, en superficial, superficial parcial, parcial profunda y completa. La extensión de piel afectada se calcula en base a la "regla de los nueve", que establece que cada parte del cuerpo corresponde a un múltiplo de 9% de la superficie corporal total. Aunque es poco frecuente en los pacientes veterinarios, quemaduras graves pueden llevar a un shock al disminuir el flujo de sangre periférica. Se debe realizar como terapia tópica inicial la tricotomía amplia seguida de la aplicación de solución salina fría, lavar con solución isotónica estéril, debridamiento, aplicación de ungüento antimicrobiano como sulfadiazina de plata y cubrir con vendas húmedas no adherentes. El debridamiento del tejido desvitalizado debe realizarse lo antes posible y, preferentemente, de forma agresiva. En la imposibilidad de realización de cirugía se puede utilizar los agentes conservadores enzimáticos de debridamiento, la inmersión en el agua y la aplicación de vendajes húmedos-húmedas. Después de la formación del lecho vascular sin tejido necrótico o infectado, quemaduras extensas se pueden cerrar mediante colgajos, injertos de piel, la técnica de avance de piel, o tratadas como herida abierta hasta que sea posible el tratamiento quirúrgico. Pueden ocurrir complicaciones como infección, cicatrización excesiva y la contractura de la herida, sobre todo cuando no hay un tratamiento temprano. El resultado estético final es generalmente satisfactorio cuando hay intervención quirúrgica y la cubierta completa de la piel. Aunque sean poco frecuentes en la medicina veterinaria, quemaduras graves son desafiantes y tienen características y terapéutica distintas de las heridas traumáticas. La abundante literatura

hasta hoy es sobre todo humana, por lo tanto se necesitan estudios veterinarios en esta área.

Palabras clave: lesión térmica, sulfadiazina de plata, desbridamiento, canina, felina.

INTRODUÇÃO

Queimaduras térmicas ocorrem quando energia na forma de calor é aplicada em ritmo maior que a capacidade dos tecidos de absorvê-la e dissipá-la (1). A condutância do tecido afetado determina a taxa de dissipação e absorção do calor por diversos fatores como, circulação periférica, conteúdo de água, espessura e pigmentação da pele e a presença de substâncias isolantes externas como pelos e a oleosidade (2,3). Em queimaduras térmicas, a ferida local ocorre devido à necrose celular provocada pelo calor (4).

Para que ocorram lesões térmicas de contato, o objeto tocado deve estar extremamente quente ou o contato deve ser anormalmente longo. Queimaduras de contato tendem a ser profundas ou de espessura completa da pele (5). Em humanos, temperaturas acima de 45°C causam necrose de coagulação e dano irreversível à pele (1). As causas de queimaduras térmicas incluem incêndios, lesões de escaldadura, contato direto ou iatrogênicas como animais anestesiados ou debilitados sobre colchões térmicos por períodos prologados (4).

REVISÃO DE LITERATURA

Zonas de Queimadura

Em uma queimadura, são descritas três zonas de lesão. A *zona de coagulação* é o ponto inicial da lesão e onde há dano máximo, consistindo de tecido que sofreu injúria celular irreversível devido à coagulação de suas proteínas constituintes (1,6,7). A *zona de estase* (ou de transição) se caracteriza pela diminuição da perfusão sanguínea tecidual devido à liberação de substâncias vasoativas causando vasoconstrição e, conseqüentemente, hipoperfusão e isquemia (1,7). O tecido nesta região tem potencial de regeneração, porém, deve-se procurar aumentar a perfusão a fim de prevenir qualquer dano que a torne irreversível, como parte da zona de coagulação (1,6). Qualquer dano adicional (i.e. hipotensão, infecção e edema) pode levar esta zona à perda completa do tecido (1). A última e mais externa é a *zona de hiperemia* onde há aumento da perfusão tecidual devido à vasodilatação mediada pela inflamação local e tecido saudável viável que irá se recuperar, ao menos que haja sepse ou hipoperfusão severa (6,7,8).

Graus de Queimadura

Cinco fatores determinam a severidade de uma queimadura, são eles: a profundidade, tamanho, área envolvida, idade e estado geral do paciente (9). As queimaduras podem ser classificadas em relação ao mecanismo/etiologia causadora da lesão, profundidade e grau de envolvimento da superfície corpórea (4). A classificação moderna das queimaduras se refere à profundidade da pele acometida, podendo ser superficiais (primeiro grau), parciais superficiais (segundo grau), parciais profundas (terceiro grau), onde há o envolvimento da epiderme, derme e tecidos hipodérmicos ou de espessura total (quarto grau), quando a lesão se aprofunda até tecidos subjacentes

(1,9,10). Atualmente, a denominação em espessura parcial ou espessura total de pele acometida é a classificação mais frequente (3,11) e mais apropriada para animais (4).

As lesões superficiais são dolorosas, espessadas, eritematosas e descamativas (1). A cura por epitelização é rápida e ocorre dentro de 3 a 5 dias, sem formação de cicatrizes (12) (Figura 1A). Queimaduras de espessura parcial causam maior destruição da derme, há edema de subcutâneo e inflamação e não há fácil repilamento (1) (Figura 1B). Ocorrem danos progressivos nas primeiras 24 horas, resultado da liberação de enzimas proteolíticas, prostaglandinas e substâncias vasoativas (1). A cura ocorre por reepitelização, em cerca de uma semana a vários meses dependendo da gravidade, geralmente não requerem enxertos e apresentam pouca ou nenhuma cicatriz (1,13,14). Se a terapia foi inefetiva, a lesão pode se tornar de terceiro grau, principalmente na presença de infecção bacteriana (9). Feridas de espessura completa formam uma escara semelhante a couro, de coloração marrom escura e insensível (1) (Figura 1C). Devido à destruição de todas as camadas cutâneas inclusive nervos, as lesões de parciais profundas geralmente são pouco dolorosas (1,10). O tratamento requer reconstrução cirúrgica, caso contrário, a cura ocorre por contração e reepitelização, gerando deformidades (1,6,12,13). As queimaduras de espessura total possuem as mesmas características que as de terceiro grau com adição dos danos se estendendo a tecidos mais profundos, como músculos e ossos (1) (Figura 1D) (Tabela 1).



Figura 1. Classificação das queimaduras. A. Canino, poodle, adulto, com queimadura superficial iatrogênica por bolsa térmica em flanco de abdome e tórax. B. Felino, sem raça definida, adulto, com queimadura parcial superficial iatrogênica por bolsa térmica em região de flanco abdominal e face externa de membro pélvico esquerdo. C. Canino, rottweiler, adulto com queimadura parcial profunda iatrogênica por colchão térmico em região de dorso de tórax. D. Canino, pastor alemão, adulto com queimadura profunda iatrogênica por unidade de eletrocoagulação e colchão térmico envolvendo dorso e flanco bilateral de abdome com exposição de processo espinhoso.

A extensão da lesão é calculada com base na porcentagem de superfície corpórea acometida (9), o que tem um grande impacto na sobrevivência (14). A estimativa do tamanho da queimadura é subjetiva em animais devido à grande quantidade de pele elástica. A “regra dos nove”, comumente usada em medicina, pode ser empregada para uma estimativa base. Ela determina que cada membro anterior corresponde a 9%, cada membro posterior 18%, cabeça e pescoço 9%, metade dorsal do tronco 18% e porção ventral do tronco 18% (4,9,10).

Tabela 1. Classificação das queimaduras. Modificado de: Vaughn e Beckel, 2012 (10).

Classificação das queimaduras	Camadas Dérmicas envolvidas	Características da ferida	Cicatrização
Superficial	Somente Epiderme	Descamação, eritema, aparência seca e escamosa	3-5 dias por re-epitelização Mínima formação de cicatriz
Parcial Superficial	Epiderme Mais de 1/3 da derme	Eritema, úmida, esbranquiçada. Bolhas dolorosas podem estar presentes; edema pode estar presente; formação de escara	1-2 semanas por re-epitelização Mínima formação de cicatriz
Parcial Profunda	Epiderme Toda a derme	Aparência avermelhada e esbranquiçada; pouca sensação dolorosa; bolhas ausentes; formação de escara	2-3 semanas Recomendada intervenção cirúrgica para evitar formação de cicatriz
Total	Epiderme, derme e tecidos subcutâneos	Formação de escara branca avascular; pelo facilmente arrancado;	Requer intervenção cirúrgica

Tratamento Sistêmico e Tópico

Ao contrário do que ocorre na medicina, a maioria das queimaduras não são ameaças imediatas à vida e comumente são iatrogênicas na tentativa de aquecer ou no uso de unidades de eletrocauterização (9). Queimaduras severas causam desarranjo da função cardiovascular em um processo semelhante ao choque (7). As alterações fisiológicas que ocorrem após queimaduras severas podem ser divididas em duas fases distintas, a fase de ressuscitação e a fase hiperdinâmica e hipermetabólica (15,16). O choque do paciente queimado se caracteriza pela depleção de volume intravascular, redução do débito cardíaco e aumento da resistência vascular sistêmica, levando à diminuição do fluxo sanguíneo periférico (7, 16, 17,18).

Após a estabilização inicial do estado geral do paciente, o objetivo deve ser o fechamento precoce da ferida. Para isso, determinar a área total acometida e a profundidade é um processo necessário e complexo (4,9,10). Feridas com acometimento total da espessura cutânea podem ser distinguidas das demais pela espessura, aparência

de couro com escaras escuras e separação entre o tecido viável e não viável que se forma após 7-10 dias (9). As queimaduras de espessura total costumam ser indolores e os pelos são removidos facilmente, o contrário ocorre com as de espessura parcial (4). Queimaduras superficiais podem se demonstrar avermelhadas, inflamadas e com uma fina crosta. Queimaduras parciais podem ser difíceis de distinguir das totais nos primeiros dias da lesão (9).

A fim de evitar contaminação da ferida queimada, devem-se prevenir o acúmulo de exsudato purulento, contaminação secundária, traumas adicionais, remover qualquer tecido não viável e promover um ambiente propício à cicatrização o mais precocemente possível (9). Deve-se realizar a tricotomia dos pelos circundantes e aplicar solução salina gelada (3-17°C) na forma de imersão ou compressão na lesão dentro de duas horas após a injúria e durante 20 minutos, a fim de diminuir a retenção térmica e reduzir o aprofundamento da lesão (9-19). Resfriar a ferida dentro de 30 minutos da lesão térmica previne os danos contínuos ao tecido, reduz a formação de edema, aumenta o ritmo de reepitelização e melhora a aparência cosmética (19-21). Aplicar água corrente se mostra melhor do que o uso de compressas molhadas, resultando em menor profundidade da lesão e melhorando a cicatrização (20). Analgesia, sedação e anestesia podem ser necessárias para alguns procedimentos (9).

A fluidoterapia é o tratamento único mais importante em pacientes com queimaduras graves, visto que o objetivo principal é manter a perfusão orgânica e evitar a isquemia tecidual, que tem potencial de agravar a lesão (22). A recomendação atual da administração de cristalóide isotônico é de 4 ml/kg por porcentagem de área acometida nas primeiras 24 horas, com metade do volume nas primeiras 8 horas (15,18,23,24,). Recomenda-se a redução de 25-50% do volume para gatos (15).

A lavagem com solução isotônica estéril na forma de chuveiro e a aplicação de pomada antimicrobiana de amplo-espectro é uma terapia inicial tópica satisfatória para lesões superficiais, parciais e nas lesões em que a abrangência não pode ser determinada (9,25). Pode-se aplicar a medicação tópica com luvas estéreis sempre após limpeza e descontaminação inicial com solução isotônica estéril e debridamento, realizando ou não cobertura com bandagens (9,26,27). O uso de fármacos por via sistêmica está desaconselhado devido à baixa concentração nos tecidos lesados causada pela microtrombose de vasos e pelo edema (26). O agente tópico usado não deve causar dor, irritação, toxicidade e deve ter mínima absorção sistêmica (9). Dos princípios ativos disponíveis, a sulfadiazina de prata é a que mais se encaixa nos critérios estabelecidos, sendo considerado o padrão ouro no tratamento de queimaduras devido ao amplo espectro de ação, boa penetração na escara e poucos efeitos colaterais (14, 16, 26, 27, 28). Recomenda-se a aplicação de sulfadiazina de prata para todas as queimaduras como terapia tópica inicial e caso a infecção seja resistente deve-se trocar o princípio ativo para acetato de mafenide ou mel terapêutico (22).

A escara de queimadura que se forma ao redor do tronco ou extremidade, resultado dos elementos cutâneos coagulados pelo calor, age como um torniquete que impede o fluxo sanguíneo e linfático (1,9). Na região torácica, a respiração pode estar comprometida (9). Embora um procedimento raro em veterinária, a escarotomia, que compreende a realização de incisões de relaxamento na escara, está indicada a fim de facilitar o debridamento enzimático (9). A deterioração dos parâmetros físicos como tempo de preenchimento capilar, percepção à dor e fluxo sanguíneo avaliado pelo fluxômetro doppler indicam a escarotomia (4). A incisão deve ser feita em profundidade suficiente para permitir a separação dos tecidos (4).

O debridamento, ou remoção de tecido desvitalizado, é fator chave no manejo de áreas queimadas parcial ou totalmente, sendo indicado nas fases precoces e de modo

agressivo a fim de atenuar a resposta hipermetabólica e diminuir a taxa de infecção (9,12,15,29-32). A remoção de tecido morto é essencial no controle da infecção bacteriana, sepse e na promoção de um leito vascular viável para o fechamento cirúrgico (6,9,33). O debridamento é utilizado como tratamento principal em feridas pequenas e superficiais, mas é empregado nas amplas e profundas até que o paciente esteja preparado para o reparo definitivo da ferida (4,34) (Figura 2).

O debridamento conservativo consiste no uso de agentes enzimáticos, imersão em água ou solução isotônica, e a aplicação de bandagens úmidas (9). São recomendados para feridas pequenas e pouco extensas ou quando o paciente não pode ser submetido à intervenção cirúrgica (9). Todos os métodos são utilizados para facilitar a separação do tecido necrótico dos adjacentes e viáveis (9). A imersão em água é o método mais difícil e demorado em cães grandes, sendo a bandagem úmida-úmida uma alternativa (9). O uso de bandagem úmida-úmida é melhor em extremidades ou áreas locais do tronco (9). A aplicação periódica de salina estéril ou ringer lactato utilizando uma seringa é necessário para compensar a evaporação da umidade da superfície da bandagem (9). A bandagem é deixada na ferida por várias horas (9). A ferida pode ser debridada durante a troca de curativos se necessário (4,9). O debridamento conservativo é usado quando o debridamento cirúrgico agressivo é difícil ou desaconselhável, como na presença de tecido necrótico aderido a tendões, ligamentos ou estruturas profundas pouco delimitadas (9) (Figura 3).

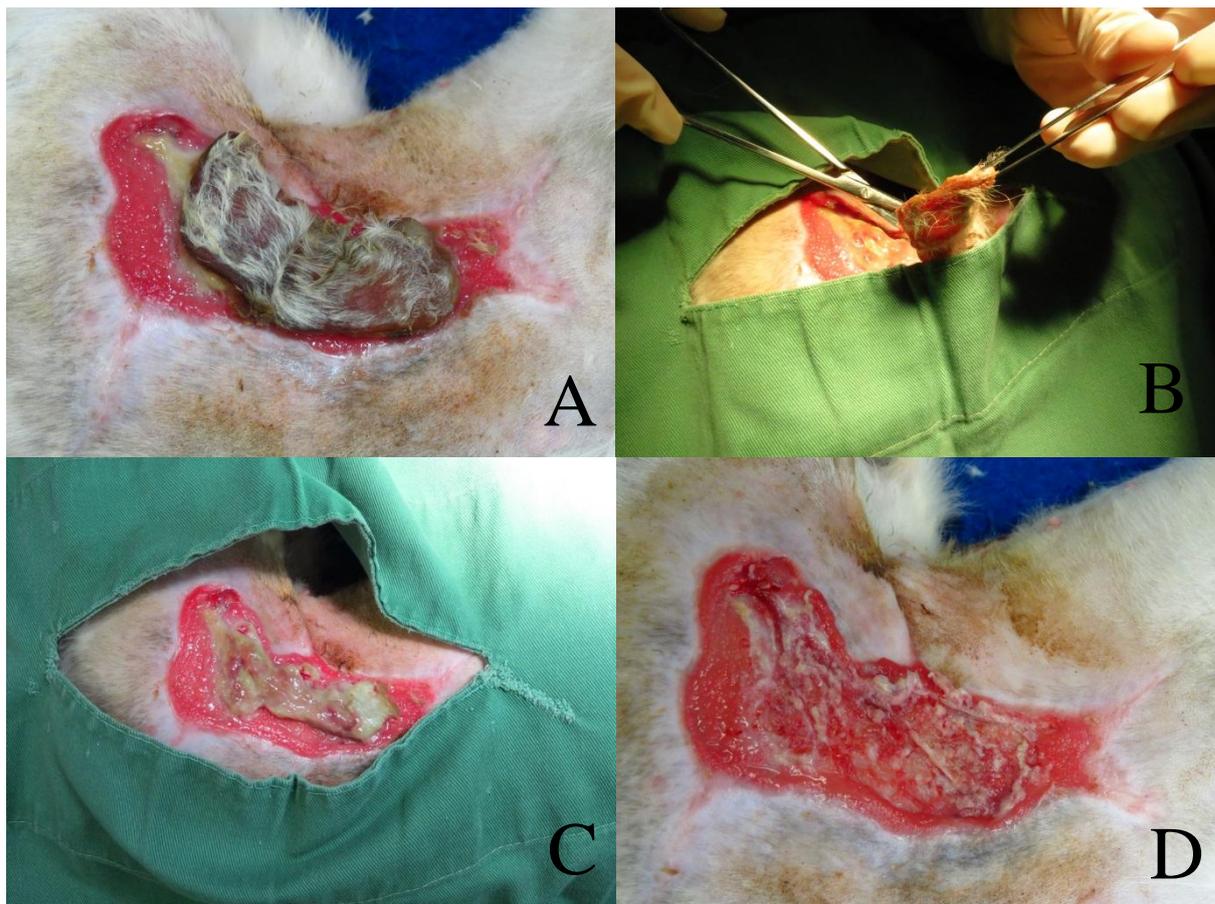


Figura 2. Debridamento cirúrgico de queimadura iatrogênica em felino. A. Queimadura antes do debridamento, com presença de escara necrosada totalmente separada do tecido saudável adjacente, com início de proliferação de tecido de granulação. B. Debridamento cirúrgico para retirada da escara e do tecido infectado subjacente. C. Após o debridamento cirúrgico, nota-se a

presença de tecido infeccionado e secreção purulenta subjacente à escara. D. Após a retirada do tecido infeccionado, nota-se a presença de tecido de granulação saudável.

O debridamento agressivo, também chamado de excisão da ferida, é a remoção da queimadura por inteira (9). É o método mais indicado em animais e deve ser acompanhado de reconstrução cirúrgica utilizando pele local, se possível, ou utilizando enxerto cutâneo, se o leito da ferida assim permitir (4) (Figura 4). Grandes áreas de necrose cutânea total impedem a formação de leito de granulação e aumenta consideravelmente o risco de infecção (9). Vários dias ou semanas podem se passar antes que a separação espontânea do tecido necrótico ocorra com o debridamento conservativo (9). Nestas circunstâncias, excisão cirúrgica sob anestesia geral tem o potencial de eliminar o tecido necrótico (4,9) e deve ser iniciada após o terceiro dia da queimadura e a estabilização inicial do paciente (30,33). As cirurgias podem ser espaçadas 2-3 dias até que a escara seja removida e a ferida esteja fechada (35). Um leito de tecido de granulação, adequado para fechamento com retalhos e enxertos, rapidamente se forma dentro de 5 a 7 dias (9). Duas técnicas são descritas para excisão da ferida em humanos: a excisão tangencial e a fascial, sendo a primeira indicada para pequenas lesões e a segunda para feridas grandes e profundas (6,33,35,36). A excisão tangencial é feita com a remoção sequencial de camadas finas da escara com o uso de um dermatomo ou uma lâmina de coleta de enxerto cutâneo até que se chegue ao tecido viável saudável e, em seguida, prossegue-se a aplicação de técnicas de reconstrução cutânea (4). Devido à exposição da derme e capilares, ocorre hemorragia significativa durante o procedimento, o que pode ser controlada por torniquete (<120 minutos) e o uso de curativos hemostáticos não aderentes com epinefrina (1:10,000) (35). A excisão fascial é a remoção da pele dermoepidérmica e tecido subcutâneo até atingir a fáscia muscular (35). Esta técnica é rápida, fácil, ocasiona menor perda de sangue e deve ser feita preferivelmente com bisturi, a fim de evitar superfícies queimadas com o uso do eletrocautério (37). Em casos de lesão no tronco e pescoço, a pele frouxa da região pode ser utilizada para o fechamento de feridas amplas após a excisão fascial (4).



Figura 3. Confeção de curativo úmido-úmido, com aplicação tópica de sulfadiazina de prata 1%. A. Ferida por queimadura com presença de tecido de granulação em região cervical e torácica dorsal. B. Aplicação de Sulfadiazina de Prata 1% de forma tópica sobre toda a superfície queimada C. Cobertura da ferida com compressa gaze úmida. D. Após a colocação de compressas cirúrgicas umedecidas foi realizada a cobertura do curativo com ataduras.

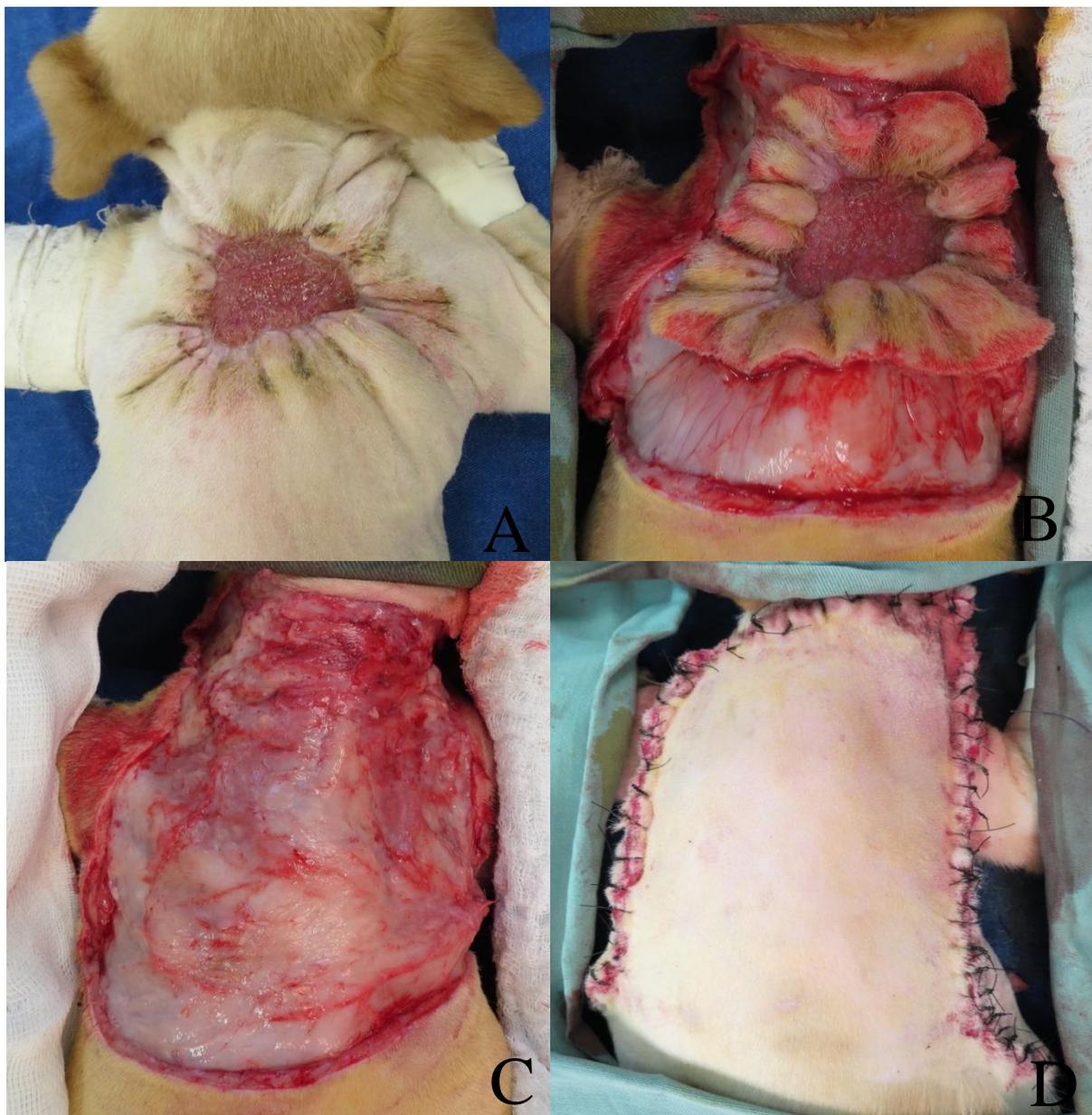


Figura 4. Excisão de uma queimadura e fechamento da ferida com retalho de avanço de padrão subdérmico em um canino filhote. A. Queimadura em região cervical dorsal após tratamento tópico com sulfadiazina de prata 1%. Observa-se a intensa contração dos bordos da ferida e a proliferação de tecido de granulação. B. Excisão *en bloc* da ferida. C. Leito da ferida livre de tecido contaminado e cicatricial após excisão. D. Aparência final do retalho de avanço subdérmico para o fechamento cosmético da lesão.

Uma vez formado o leito vascular livre de tecido necrótico e infecção, há várias opções para seu fechamento (9). Queimaduras extensas normalmente requerem fechamento com retalhos e enxertos cutâneos dependendo de sua extensão e localização (9). Enquanto aloenxertos e xenoenxertos podem ser usados para cobertura temporária de queimaduras térmicas em humanos, enxertos autógenos livres são necessários para cobertura permanente de feridas térmicas extensas e totais (9). O uso de enxerto parcial colhido com dermatomo e colocado na forma de malha com uma relação 3:1 é considerado a melhor técnica de enxertos livres para recapeamento de feridas extensas (9). Retalhos de padrão axial podem ser usados sozinhos ou em combinação com enxertos livres e/ou com técnicas de avanço de pele (9). Se a reconstrução não puder ser

feita imediatamente, deve-se tratar a ferida como aberta até que haja tecido de granulação saudável para que se apliquem enxertos ou retalhos (4).

A cicatrização excessiva e a contratura da ferida são sérias complicações de pacientes queimados, frequentemente ocorrendo quando não se estabelece tratamento médico ou cirúrgico para feridas sérias (9). Z-plastias, enxertos pediculados e enxertos livres podem ser necessários para evitar e tratar contraturas (9). A prevenção da contratura é preferível ao tratamento após sua formação (9).

O resultado cosmético depende da extensão da lesão, no entanto, ao contrário do que ocorre em humanos, o crescimento piloso é um componente essencial para os animais (9). A cobertura completa com retalhos e enxertos totais promove adequada cobertura pilosa e, quando associada à contração da ferida, reduz consideravelmente a visibilidade da cicatriz (9). De modo geral, o manejo cirúrgico de queimaduras está limitado a feridas cutâneas de espessura total, especialmente quando a ferida envolve uma área significativa do paciente (9).

CONCLUSÕES

Apesar de incomuns em medicina veterinária, queimaduras graves são verdadeiros desafios terapêuticos, devido a potencial instabilidade sistêmica do animal e a gravidade das lesões cutâneas. Diferentemente dos demais tipos de lesões cutâneas, queimaduras apresentam características únicas e condutas terapêuticas diferenciadas. Deve-se estar ciente da necessidade de terapia emergencial agressiva para evitar as fases hipodinâmicas e hiperdinâmica/hipermetabólica em casos onde haja desarranjo sistêmico. Como observado, a terapia tópica, como o resfriamento da ferida, debridamento, aplicação de agentes antimicrobianos tópicos e bandagens não-aderentes, são questões fundamentais para o sucesso no tratamento. No ramo cirúrgico, o fechamento de grandes extensões lesadas comumente envolve o uso de técnicas complexas de cirurgia plástica-reparadora após rápida excisão da ferida. Por fim, devido ao baixo número de pequenos animais acometidos, a maioria das recomendações diagnóstico e terapêutica está baseada na literatura humana. São necessários mais estudos veterinários para validar estas informações.

REFERÊNCIAS

1. Hedlund CS. Surgery of the integumentary system. In: Fossum TW. Small animal surgery. 3rd ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2007. p.159-232.
2. Achauer BM, Martinez SE. Burn wound pathophysiology and care. Crit Care Clin. 1985;1:47.
3. Baxter CR, Waeckerie JF. Emergency treatment of burn injury. Ann emerg Med. 1988;17:1305.
4. Pope ER. Queimaduras térmicas, elétricas e químicas, e criolesões. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 3a ed. Barueri: Manole; 2003. p.356-72.
5. Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns pathophysiology and types of burns. BMJ. 2004; 328:1427-9.
6. Bishop JF. Burn wound assessment and surgical management. Crit Care Nurs Clin North Am. 2004;16:145-77.

7. Keck M, Herndon DH, Kamolz LP, Frey M, Jeschke MG. Pathophysiology of burns. *Wien Med Wochenschr.* 2009;159:327-36.
8. Cameron AM, Ruzehaji N, Cown AJ. Burn wound management: a surgical perspective. *Wound Pract Res.* 2010;18:35-40.
9. Pavletic MM. Management of specific wounds. In: *Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery.* 3rd ed. Iowa: Wiley-Blackwell; 2010. p.170-181.
10. Vaughn L, Beckel N. Severe burn injury, burn shock, and smoke inhalation injury in small animals Part 1: burn classification and pathophysiology. *J Vet Emerg Crit Care.* 2012;22:179-86.
11. Bayley EW. Wound healing in the patient with burns. *Nurs Clin North Am.* 1990;25:205.
12. Pavletic MM, Trout NJ. Bullet, bite, and burns wound in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2006;36:873-93.
13. Desanti LB. Pathophysiology and current management of burn injury. *Adv Skin Wound Care.* 2005;18:323-32.
14. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Environmental skin disease: burns. In: *Muller and Kirk's small animal dermatology.* 6th ed. Philadelphia: Saunders; 2001. p.1083-7.
15. Saxon WD, Kirby R. Treatment of acute burn injury and smoke inhalation. In: *Kirk RW, Bonagura JD. Kirk's veterinary therapy XI.* 11th ed. Philadelphia: Saunders; 1992. p.146-53.
16. Sheridan RL. Burns. In: *Fink MP, Abraham E, Vincent JL, Kochanek PM. Textbook of critical care.* 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p.2065-75.
17. Warden GD. Burn shock resuscitation. *World J Surg.* 1992;16:16-23.
18. Latenser BA. Critical care of the burn patients: the first 48 hours. *Crit Care Med.* 2009;37:2819-26.
19. Cuttle L, Kempf M, Kravchuk O, Phillips GE, Mill J, Wang XQ, et al. The optimal temperature of first aid treatment for partial thickness burn injuries. *Wound Repair Regen.* 2008;16:626-34.
20. Yuan J, Wu C, Holland AJ, Harvey JG, Martin HC, La Hei ER, et al. Assessment of cooling on an acute scald burn injury in a porcine model. *J Burn Care Res.* 2007;28:514-20.
21. Cuttle L, Pearn J, McMillan JR, Kimble RM. A review of first aid treatments for burn injuries. *Burns.* 2009;35:768-75.

22. Vaughn L, Beckel N, Walters P. Sever burn injury, burn shock, and smoke inhalation injury in small animals Part 2: diagnosis, therapy, complications, and prognosis. *J Vet Emerg Crit Care*. 2012;22:187-200.
23. Pham TN, Cancio LC, Gibran NS. American burn association practice guidelines burn shock resuscitation. *J Burn Care Res*. 2009;29:2819-26.
24. Tricklebank S. Modern trends in fluid therapy for burns. *Burns*. 2009;35:757-67.
25. Mayhall CG. The epidemiology of burn wound infections: then and now. *Clin Infect Dis*. 2003;37:543-50.
26. Honari S. Topical therapies and antimicrobial in the management of burn wounds. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2004;16:1-11.
27. Duffy BJ, McLaughlin PM, Eichelberger MR. Assessment, triage, and early management of burns in children. *Clin Pediatr Emerg Med*. 2006;7:82-92.
28. Mually C, Carey K, Seshadri R. Use of nanocrystalline silver dressing and vacuum-assisted closure in a severely burned dog. *J Vet Emerg Crit Care*. 2010;20:456-63.
29. Williams FN, Jeschke MG, Chinkes DL, Suman OE, Branski LK, Herndon DN. Modulation of the Hypermetabolic Response to trauma: temperature, nutrition, and drugs. *J Am Coll Surg*. 2009;208:489-502.
30. Guo ZR, Sheng CY, Diao L, Gao WY, Yang HM, Lin HY, et al. Extensive wound excision in the acute shock stage in patients with major burns. *Burns*. 1995;21:139-42.
31. Grunwald TB, Garner WL. Acute burns. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121:311e-9e.
32. Maass DL, Hybki DP, White J, Horton JW. The time course of cardiac NF-kappaB activation and TNF-alpha secretion by cardiac myocytes after burn injury: contribution to burn-related cardiac contractile dysfunction. *Shock*. 2002;17:293-9.
33. Orgill DP. Excision and skin grafting of thermal burns. *N Engl J Med*. 2009;360:893-901.
34. Jordan BS, Harrington DT. Management of the burn wound. *Nurs Clin North Am*. 1997;32:251.
35. Mosier MJ, Gibran NS. Surgical excision of the burn wound. *Clin Plast Surg*. 2009;36:617-25.
36. Johnson RM, Richard R. Partial-Thickness burns: identification and management. *Adv Skin Wound Care*. 2006;16:178-85.
37. Waymack JP, Pruitt BA. Burn wound care. *Adv Surg*. 1990;23:261.

Recebido em: 31/08/2014

Aceito em: 24/04/2015

FATORES ENVOLVIDOS NOS MECANISMOS DE ABERTURA CERVICAL EM CADELAS COM PIOMETRA

Rodrigo Volpato¹
Maria Denise Lopes²

RESUMO

No Brasil, existe uma grande população de cadelas com risco de desenvolver um quadro de piometra, pois apenas uma pequena porcentagem de cadelas sadias é normalmente submetida à ovariosalpingohisterectomia eletiva. A patogênese da piometra canina não é completamente esclarecida e pode se apresentar de forma aberta ou fechada, caracterizada pela presença ou ausência de secreção vaginal, respectivamente. O relaxamento cervical é um fator importante para o diagnóstico, para o estabelecimento do prognóstico e para a escolha do tratamento eficiente. A indução do relaxamento cervical, independente do ciclo estral, poderia também facilitar a realização de exames citológicos e histopatológicos do endométrio para diagnóstico de processos inflamatórios e neoplásicos. Inúmeros fatores devem ser considerados quando se estuda os mecanismos de abertura e fechamento cervical, tais como: a concentração sérica de estrógeno e progesterona, os receptores hormonais no útero, a porcentagem de colágeno na cérvix, infiltrado inflamatório, prostaglandinas, interleucinas e óxido nítrico. O objetivo desta revisão bibliográfica é elucidar possíveis fatores envolvidos nos mecanismos de abertura cervical em cadelas portadoras de piometra.

Palavras-chave: piometra, cérvix, cadela.

FACTORS INVOLVED IN OPENING CERVICAL MECHANISMS IN BITCHES WITH PYOMETRA

ABSTRACT

In Brazil, there is a large population of female dogs at risk of developing pyometra, since only a small percentage of healthy bitches is usually submitted to elective ovariohysterectomy. Pathogenesis of canine pyometra is not fully understood and can be presented in open or closed forms characterized by the presence or absence of vaginal discharge, respectively. The cervical opening is an important factor for diagnosis, prognosis and for choosing an effective treatment. The cervical opening, regardless of the estrous cycle, would also facilitate cytological and histopathological tests for endometrial inflammatory and neoplastic processes diagnosis. Numerous factors must be considered when studying the mechanisms of cervical opening and closing, such as the serum concentration of estrogen and progesterone hormone, receptors in the uterus, the percentage of collagen in the cervix, inflammatory infiltrate, prostaglandins, interleukins and nitric oxide. The aim of this review is to elucidate the factors involved in the mechanisms of cervical opening in bitches with pyometra.

Keywords: pyometra, cervix, bitch.

¹ Doutorando do Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-UNESP/Botucatu. Contato principal para correspondência

² Professora Titular do Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-UNESP/Botucatu

FACTORES QUE INTERVIENEN EN LOS MECANISMOS DE APERTURA CERVICAL EN PERRAS CON PIOMETRA

RESUMEN

En Brasil, hay una gran población de perros con riesgo de desarrollar un panorama de la piometra ya que sólo un pequeño porcentaje de perros sanos se presenta generalmente a ovariohisterectomía electiva. La patogénesis de la piometra canina no se entiende completamente y puede presentar una forma abierta o cerrada, caracterizado por la presencia o ausencia de secreción vaginal, respectivamente. El relajamiento cervical es un factor importante para el diagnóstico, para establecer el pronóstico y para elegir el mejor tratamiento. La inducción de la relajación cervical, independiente del ciclo estral, también podría facilitar los exámenes citológicos e histopatológicos del endométrio para el diagnóstico de procesos inflamatorios y neoplásicos. Hay numerosos factores que deben tenerse en cuenta al estudiar los mecanismos de apertura y cierre de cuello de útero, como la concentración sérica de estrógeno y progesterona, los receptores de hormonas en el útero, el porcentaje de colágeno en el cuello del útero, infiltrado inflamatorio, prostaglandinas, interleucinas y óxidos de nitrógeno. El propósito de esta revisión de la literatura es dilucidar los factores que intervienen en los mecanismos de la abertura del cuello uterino en las hembras que sufren de piometra.

Palabras clave: piometra, cervix, perra.

INTRODUÇÃO

A cadela é uma espécie monoéstrica anual, não estacional, sendo que as ovulações ocorrem uma ou duas vezes ao ano com intervalos de cinco a doze meses (1). Nos últimos anos, o conhecimento a respeito da fisiologia reprodutiva dos cães aumentou muito, mas doenças importantes e frequentes na clínica reprodutiva, como a piometra, ainda não são completamente elucidadas, existindo, inclusive, controvérsias entre os autores quanto a sua etiologia (2).

No Brasil, existe uma grande população de cadelas com risco de desenvolver um quadro de piometra, pois apenas uma pequena porcentagem de cadelas sadias é normalmente submetida à ovarioalpingohistectomia (OSH) eletiva. Em nosso país, a maioria das castrações é realizada como consequência de alterações clínicas. A situação é diferente em outros países onde a prática da castração é comum e realizada em mais de 85% das cadelas (3).

A patogênese da piometra canina não é completamente esclarecida, a despeito de décadas de estudo sobre a etiologia desta doença. O conceito de Síndrome Hiperplasia Endometrial Cística/Piometra, introduzido por Dow (4-5), sugere que mudanças hormonais são responsáveis por um quadro de hiperplasia endometrial cística (HEC) que tornam o útero mais susceptível à infecção bacteriana secundária. Dow (5) e Sandholm et al. (6) propuseram que a endometrite subaguda é seguida pela HEC, a qual predispõe a piometra.

Doenças uterinas ligadas com o ciclo estral são importantes causas de infertilidade em carnívoros. Alterações hormonais resultantes de uma fase proliferativa longa, folículos ovarianos persistentes ou cistos ovarianos e infecções bacterianas apresentam uma influência importante no útero, provocando sua degeneração (7). A fase progestacional prolongada, invariavelmente após cada fase folicular, simultaneamente à participação bacteriana são os fatores mais importantes para a etiologia da piometra.

Clinicamente, a piometra pode se apresentar de forma aberta ou fechada, caracterizada pela presença ou ausência de secreção vaginal, respectivamente. A cérvix é considerada uma

barreira física importante, prevenindo a infecção ascendente pela secreção de muco e constrição. Na mulher, a dilatação cervical durante o parto correlaciona-se com a extensão do infiltrado de neutrófilos, entretanto, os mecanismos de dilatação cervical nas cadelas não são totalmente esclarecidos (8).

A abertura ou fechamento da cérvix nas cadelas são ciclo dependente. Sob a influência estrogênica, a cérvix se abre permitindo a entrada de bactérias da microbiota normal da vagina para o interior do lúmen uterino. Os produtos da secreção das glândulas, inicialmente estéreis, contêm nutrientes e pH favoráveis ao crescimento bacteriano e, com a diminuição da resposta inflamatória, a piometra pode se instalar (9, 10). Trabalhos envolvendo investigação sobre a indução de piometra canina demonstraram que entre os dias onze e trinta, após o pico de LH, o útero torna-se mais susceptível à infecção (11).

Algumas cadelas com piometra aberta podem apresentar fechamento da cérvix durante o curso da doença, assim como cadelas com piometra fechada podem apresentar abertura cervical. Esse mecanismo de abertura e fechamento cervical pode ser devido a interações hormonais, ou pode ser apenas um fator mecânico pela pressão exercida pelo próprio acúmulo de secreção no interior do útero. De qualquer forma, o mecanismo de relaxamento cervical necessita maiores estudos.

A taxa de mortalidade da piometra é de 3 a 4 % em países desenvolvidos que apresentam modernas rotinas de tratamento. O diagnóstico tardio e/ou tratamento pode conduzir esses animais a sépsis e ao desfecho fatal (12). As piometras abertas são menos tóxicas e mais fáceis de serem tratadas. Portanto, ao se conhecer os mecanismos de relaxamento cervical, seria possível, no mínimo, estimular a abertura cervical e induzir a eliminação do conteúdo uterino. Esta revisão bibliográfica visa atualizar os conhecimentos sobre a piometra canina, principalmente no tocante aos mecanismos de abertura e fechamento cervical nas cadelas.

FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL

O ciclo estral possui duração de 5 a 12 meses e consiste de quatro fases consecutivas: anestro (com duração de 80 a 240 dias), proestro (3 a 16 dias), estro (4 a 12 dias) e o diestro relativamente longo (60 a 90 dias) (7,13). A puberdade nas cadelas ocorre entre 6 e 14 meses de idade, variando de acordo com a raça e porte do animal (13). O ciclo estral das cadelas é conhecido como um dos mais primitivos de todos os mamíferos (7).

Dentre os hormônios relevantes no ciclo estral das cadelas, o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH), estrógeno e progesterona são os mais envolvidos. Sob a influência do FSH, os folículos ovarianos se desenvolvem e as células foliculares produzem estrógenos, os quais estimulam a proliferação das células epiteliais da mucosa vaginal, aumentam a espessura da camada endometrial, promovem abertura da cérvix, aumentam o fluxo sanguíneo e a resposta inflamatória celular. As respostas ou efeitos provocados pelos estrógenos e progesterona no útero têm efeito cumulativo a cada ciclo estral (9,10).

A piometra tem sido associada a repetidas respostas ao estrógeno durante o estro, seguida por longos intervalos de dominância da progesterona, levando a modificações no endométrio (11,14). A estimulação progesteracional resulta em proliferação do endométrio, secreção das glândulas uterinas e diminuição das contrações do miométrio. A inibição leucocitária no útero sensibilizado pela progesterona facilita a infecção bacteriana. O endométrio, sob o estímulo da progesterona, torna-se hiperplásico devido ao aumento no número e no tamanho de suas glândulas, as quais aumentam a atividade secretora e um fluido estéril pode se acumular no lúmen do útero. As respostas aos efeitos hormonais podem ser mais exacerbadas com o uso de progestágenos exógenos (14-16).

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ABERTURA CERVICAL

A cérvix apresenta poucas fibras musculares lisas e grande quantidade de tecido conjuntivo. A mucosa cervical é constituída por epitélio prismático simples de células produtoras de muco e lâmina própria onde se encontram as glândulas cervicais. Na fase secretória do ciclo estral, os elevados níveis de progesterona influenciam as glândulas a produzirem um muco viscoso, o qual impede a passagem de micro-organismos e de espermatozoides para o interior da cavidade uterina (17).

As propriedades mecânicas da cérvix são derivadas da concentração de colágeno, uma vez que o músculo liso constitui apenas 15% da massa do órgão. Feixes de colágeno proporcionam rigidez, a qual pode ser alterada rapidamente por ação das colagenases. A fonte de colagenase e seu controle são temas atuais de pesquisas e debates. Os colágenos da cérvix são principalmente dos tipos I, III e IV, tornando a cérvix uma estrutura bastante rígida, sendo a colagenase a enzima necessária para o relaxamento do órgão (18).

Os tratamentos clínicos da piometra envolvem medicamentos que estimulam a contração uterina, além disso, o relaxamento cervical é um fator importante para o diagnóstico, para o estabelecimento do prognóstico e para a escolha de um tratamento eficiente, pois a parede uterina muitas vezes apresenta-se friável e pode se romper, contaminando a cavidade abdominal (19).

Os mecanismos envolvidos na abertura e fechamento da cérvix não são completamente elucidados e inúmeros fatores devem ser considerados.

Nível Sérico de Estrógeno e Progesterona

O estrógeno induz a proliferação das glândulas endometriais e a progesterona induz a ramificação glandular, sendo também responsável pelo início da secreção glandular para o lúmen uterino (20).

Ainda é desconhecido o processo pelo qual podemos diferenciar a formação de piometra aberta ou fechada. Algumas hipóteses já foram levantadas, sendo a de Weiss et al. (1) bastante expressiva. Ao analisar a concentração hormonal de cadelas com diagnóstico de piometra, cadelas em diestro ou início de anestro, o estradiol não apresentou diferença significativa entre o grupo piometra aberta e piometra fechada. Quanto à análise da progesterona, os resultados apresentaram diferenças significativas sendo de $4,8 \pm 0,9$ ng/mL para a piometra aberta e de $13,2 \pm 5,5$ ng/mL para a piometra fechada.

No estudo realizado por Volpato (21), não foi observada diferença significativa entre as concentrações de progesterona quando foram comparados os grupos de piometra aberta e fechada. No referido trabalho, foram observadas variações individuais de 0,54 ng/mL a 35,43 ng/mL. Segundo o autor, tal variação deve-se à fase do ciclo estral no qual foi realizado o diagnóstico de piometra. Resultado semelhante foi encontrado no estudo realizado por Tamada et al. (19).

O aglepristone, que tem forte afinidade pelos receptores de progesterona, é utilizado no tratamento de piometra com a intenção de diminuir a ação desse hormônio e culminar na abertura cervical. O uso dessa medicação terapêutica tem sido bastante eficiente, é sabido do envolvimento da progesterona no mecanismo de abertura cervical, mas sua real função ainda precisa ser esclarecida (22).

Receptores de estrógenos e de progesterona

Investigações têm explorado a possibilidade de a piometra canina ser induzida por resposta exagerada do útero a níveis normais de hormônios (23). A expressão de receptores parece ser diferente no útero comprometido com HEC e piometra quando comparado com o

útero de cadelas sadias (20,23).

Estudos sobre receptores hormonais no útero de cadelas já foram realizados. Segundo Kunkitti et al. (24), os receptores de estrógeno e progesterona controlam a abertura e fechamento cervical durante o ciclo estral, porém, o mecanismo envolvido, as mudanças e associações bioquímicas que ocorrem nesse processo não são totalmente esclarecidos.

No estudo realizado por De Bosschere et al. (25) avaliou-se, por ensaio imunoistoquímico, a expressão de receptores estrogênicos (RE) e receptores de progesterona (RP) no útero de cadelas normais, com piometra e com HEC. As contagens de RE e RP foram mais elevadas nos animais com HEC, quando comparadas ao útero de cadelas normais ou portadoras de piometra, sendo a menor expressão desses receptores em cadelas com piometra. As diferenças na expressão de receptores de estrógeno e progesterona sugerem fatores distintos na patogênese da HEC e da piometra. Assim, pode-se deduzir que a piometra é desencadeada por uma cascata de fenômenos iniciada apenas pela infecção bacteriana e não pela HEC.

Em consequência da expressão aumentada do RE em cadelas com HEC, o endométrio permanece responsivo ao estrógeno, mesmo com níveis circulantes baixos. Isto pode esclarecer a contínua proliferação das glândulas endometriais durante o estágio de forte influência progesterônica. A ação prolongada simultânea do estrógeno e da progesterona poderia explicar as mudanças na proliferação cística que são características da piometra (20).

Volpato et al. (26), utilizando a técnica de imunoistoquímica, pesquisaram receptores de estrógeno α e β no útero e cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada. No referido estudo, foi realizada a identificação e quantificação de tais receptores tanto nas regiões glandular e do estroma uterino, bem como nas regiões epitelial, glandular e do estroma da cérvix. Não foi verificada diferença estatística entre os grupos piometra aberta e piometra fechada em relação à expressão dos receptores de estrógeno α e β e dos locais avaliados.

Comparando a imunorreatividade dos RE α entre as diferentes regiões do útero, Volpato et al. (26) observaram que o epitélio glandular foi corado com maior intensidade do que o estroma. Também na cérvix, o epitélio glandular foi corado mais intensamente quando comparado ao estroma e ao epitélio luminal. Levando em consideração que a concentração de receptores é diretamente proporcional à intensidade da marcação, a região com o maior número de RE α no útero e cérvix é o epitélio glandular. Tais resultados vão de encontro aos observados por Dhaliwal et al. (27), os quais encontraram um escore muito baixo de RE e RP no epitélio glandular do útero.

O número de núcleos positivos para receptores de estrógeno e progesterona não diferiram entre as cadelas com piometra aberta e fechada (24, 26). Entretanto, Volpato et al. (26) identificaram diferenças na marcação dos RPs. Houve maior concentração de receptores de progesterona na cérvix de cadelas com piometra fechada e a reatividade foi mais intensa no estroma quando comparada ao epitélio glandular e luminal.

Os receptores de progesterona são menos expressos no útero de cadelas com HEC/piometra, quando comparadas às fêmeas controle, sadias, durante todo o diestro. Os escores imunoistoquímicos de RPs nas várias camadas do útero com HEC/piometra durante o diestro foram também baixos de acordo com Dhaliwal et al. (27).

Colágenos I e III

O relaxamento da cérvix é regulado pela musculatura lisa, tecido fibroso e elastina. A remodelação da matriz extracelular tem um papel importante na dilatação cervical pela degradação do colágeno. Em trabalho realizado por Chatdarong et al. (28), foi postulado que o útero de cadelas cíclicas tem maior proporção de colágeno em comparação à musculatura lisa, provavelmente em associação ao aumento do estradiol durante o estro. Tal característica histológica gera menor resistência à tração, causando o relaxamento da cérvix. Resultado

semelhante foi observado pelos mesmos autores nas cadelas com piometra de cérvix aberta, sugerindo que a abertura da cérvix está associada à maior proporção de colágenos frente a fibras musculares.

Dezenove tipos de colágenos já foram identificados e a cérvix inclui principalmente os tipos de colágenos I e III. Fisiologicamente, na cérvix aberta, não se observam fibras elásticas e as fibras de colágeno se encontram numa densidade menor quando comparadas à cérvix fechada, onde as fibras de colágeno se encontram mais densas e ordenadas. À medida que a dilatação cervical aumenta, as fibras de colágeno tornam-se mais finas e os espaços entre as fibras, maiores (19).

Volpato et al. (26), utilizando a técnica de imunistoquímica, identificaram receptores para colágeno I e III nas regiões glandular e muscular, tanto do útero quanto da cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada. Os resultados não demonstraram diferenças significativas entre as duas condições avaliadas ou entre as regiões investigadas. O aumento nas concentrações de colágeno não foi identificado na piometra fechada, conforme sugerido por Tamada et al. (19).

Agentes etiológicos e infiltrado inflamatório

A interação da progesterona e do estrógeno é importante no desenvolvimento da piometra, mas a progressão e severidade dessa enfermidade são influenciadas pela migração de bactérias por via ascendente (5).

A bactéria com maior incidência no útero de cadelas com piometra é a *Escherichia coli*, isolada de 57% a 96% das amostras uterinas. Ocasionalmente, outras bactérias como *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sp.*, *Streptococcus canis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa* são isoladas do útero de animais infectados (1,12,29). A origem destes micro-organismos é o próprio intestino e trato urinário (1,30,31).

A infecção da cérvix e útero podem levar ao enfraquecimento da cérvix. A atividade da enzima *prostaglandina desidrogenase* é reduzida na presença de infecções, permitindo, portanto, a atuação da prostaglandina na cérvix (1,18).

O relaxamento cervical nas cadelas é normalmente associado à fase de proestro e estro. A contaminação bacteriana do útero ocorre durante tais fases do ciclo estral, não havendo, portanto, diferença entre a piometra aberta e fechada em relação ao momento da contaminação bacteriana. Volpato (21) não encontrou diferença no agente bacteriano isolado nas cadelas com piometra aberta e fechada.

A dilatação da cérvix em fêmeas híginas e com doenças uterinas pode ser controlada por mecanismos diferentes. A expressão dos receptores de estrógenos e progesterona é influenciada pelo ciclo estral em cadelas. A infiltração de neutrófilos no tecido cervical está envolvida na dilatação cervical e pode ocorrer em cadelas com piometra, independente da fase do ciclo estral (24).

Remodelações no tecido da cérvix durante o parto resultam em rápida abertura cervical, caracterizada por infiltração de neutrófilos e macrófagos. Os leucócitos parecem participar da reorganização do tecido conjuntivo da cérvix durante o parto e esse mesmo mecanismo talvez ocorra nos casos de piometra aberta nas cadelas (24)

O relaxamento da cérvix está associado com o influxo de leucócitos, incluindo os neutrófilos, os quais têm um elevado potencial para a liberação de colagenase que podem fazer a quebra do colágeno, este último responsável por proporcionar a rigidez da cérvix. Os neutrófilos são importantes fontes de colagenases específicas, contidas dentro do subconjunto de grânulos do citoplasma (18).

A invasão de células inflamatórias tem sido sugerida como uma possível causa de degradação de colágenos e relaxamento cervical. Em mulheres, o grau de dilatação cervical

está diretamente relacionado com a extensão do infiltrado neutrofílico, o qual pode, posteriormente, produzir enzimas colagenolíticas, como proteases e metaloproteinases. O aumento de tais enzimas pode degradar o colágeno recém-sintetizado e, assim, diminuir a proporção colágeno/musculatura lisa na cérvix, interferindo no grau de relaxamento cervical em cadelas com doenças uterinas (24).

No trabalho realizado por Volpato et al. (32), utilizando seis cadelas com piometra aberta e seis cadelas com piometra fechada, não foi encontrada diferença significativa entre o infiltrado leucocitário, tanto no total dos leucócitos, como na quantificação de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos e plasmócitos. De acordo com os referidos resultados, a infiltração leucocitária não está associada à abertura cervical na piometra canina.

Prostaglandinas

O mecanismo de dilatação da cérvix inclui uma série de interações por meio de reações químicas estimuladas por diferentes hormônios. A enzima ciclo-oxigenase-2 está envolvida com o aumento local de prostaglandina E2 (PGE2); o qual conduz a diversas alterações associadas ao amadurecimento cervical, tais como a dilatação dos pequenos vasos, aumento da degradação do colágeno, aumento do ácido hialurônico, aumento da quimiotaxia dos leucócitos e aumento do estímulo e liberação da interleucina-8 (IL-8) (33).

A deposição de PGE2 na vagina ou cérvix da mulher, ovelha, égua e vaca origina relaxamento e dilatação cervical *in vivo*, independentemente do estado fisiológico e das concentrações de progesterona. Na mulher, a aplicação de prostaglandinas na cérvix, antes do parto, induz a dilatação cervical (34,35)

Algumas prostaglandinas diminuem a atividade contrátil da musculatura cervical, sendo a PGE2 aquela que apresenta a atividade inibidora mais potente, mesmo em doses baixas. As prostaglandinas facilitam a dilatação cervical ao induzirem a liberação de colagenases, as quais promovem a quebra do colágeno e, como consequência, o relaxamento cervical. O misoprostol, um análogo sintético da PGE1, tem se mostrado altamente eficiente na indução da abertura cervical e no estímulo da atividade contrátil do miométrio (18,34,35).

O mecanismo de ação das prostaglandinas na abertura cervical ainda não está completamente elucidado. É sabido que as prostaglandinas estão envolvidas no amadurecimento cervical fisiológico, sendo os fibroblastos cervicais iniciadores do processo, controlando a permeabilidade e dilatação dos pequenos vasos sanguíneos. As prostaglandinas podem também apresentar efeito direto na estimulação da matriz metaloproteinase. O efeito vasoativo da PGE2 facilita a penetração de leucócitos na cérvix e os neutrófilos abundantes na circulação periférica são uma fonte importante de colagenase para o amadurecimento cervical final (18).

Interleucina

A etiopatologia da piometra vem sendo estudada há décadas e pouco se sabe sobre a ocorrência das células do sistema imunitário no útero canino. Sem dúvida, a falha de imunidade uterina local tem importância no desenvolvimento da piometra (36).

Na instalação da piometra, há recrutamento de leucócitos, citocinas e quimiocinas, os quais desempenham papel crucial na regulação da inflamação e da migração de células do sistema imunológico. Como esperado, as citocinas pró- inflamatórias precoces (IL-1B e TNF- α) foram encontradas em alta quantidade nos úteros de cadelas com piometra. Em contraste, a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 permaneceu inalterada, em comparação a úteros normais. (36)

A presença e migração de células inflamatórias podem causar o aumento das atividades da enzima óxido nítrico sintetase, juntamente com outros agentes inflamatórios, tais como a

interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa e interleucina-8 (IL-8). Tais mecanismos parecem estar envolvidos na abertura cervical, devido ao processo de remodelação do tecido inflamatório e quebra de pontes químicas entre as fibras de colágeno (33).

O início da abertura cervical nas mulheres pode envolver agentes quimiotáticos neutrofílicos, tais como a IL-8, que tem sido utilizada para promover o amadurecimento de cérvix em cabaia. A estimulação da IL-8 pode ocorrer nos fibroblastos ou em monócitos, em sinergismo com a prostaglandina E2 (18,33).

A IL-8 tem efeito seletivo na estimulação da liberação de metaloproteinases e grânulos que contêm a colagenase. O neutrófilo é uma fonte quase ilimitada de colagenase, carregada para os tecidos por agentes quimiotáticos. A IL-8 de indução e de ativação dos neutrófilos causa o relaxamento cervical em mulheres da mesma maneira que a IL-8 exógena induz a maturação em cobaias (18).

Estudos recentes indicam que a expressão local de IL-8 na cérvix está associada ao relaxamento e à infiltração de neutrófilos. Tamada et al. (19) relataram que a expressão de IL-8 foi positivamente associada à permeabilidade e número de neutrófilos na cérvix, o que sugere que as interleucinas podem concentrar neutrófilos na região e influenciar a permeabilidade.

A interleucina 17, originalmente identificada como linfócito T citotóxico, foi descrita pela primeira vez em 1993 em ratos e humanos. Dois anos depois, esta proteína foi descrita como uma nova citocina e chamada interleucina 17, a qual já foi encontrada em doenças de vias aéreas, gastrintestinais, articulações, de glândulas mamárias e útero de cadelas com piometra (36,37). A IL-17 está envolvida na resposta imune inata de muitos patógenos, incluindo *E. coli* e desempenha papel na regulação da inflamação no trato reprodutivo (36,38)

Os referidos resultados mostram que as interleucinas são muito importantes em doenças inflamatórias, mas ainda há poucos resultados sobre seu papel na piometra canina, sendo um importante campo de estudo para o futuro.

Óxido nítrico

O óxido nítrico (ON) é um radical livre altamente reativo, o qual desempenha importantes funções em diversos sistemas fisiológicos. Ao longo da última década, diversas linhas de pesquisa convergiram para demonstrar que o ON é modulador de processos fisiológicos e patológicos em mamíferos (39).

O ON atua como potente vasodilatador, sendo sintetizado no processo de conversão de L-arginina em l-citrulina pela ON sintetase (NOS). Há três isoformas: endotelial (e-NOS), neuronal (n-NOS) e induzível (i-NOS). As duas primeiras isoformas são dependentes de cálcio, enquanto a iNOS é induzida por citocinas, fatores de crescimento e reação inflamatória (40,41).

O ON parece desempenhar papel importante no processo de relaxamento cervical, visto que seu aumento leva à elevação na atividade de metaloproteinase, apoptose celular e síntese de glicosaminoglicano. Todas estas modificações estão associadas ao processo de amadurecimento cervical. Com o desenvolvimento da piometra, ocorre aumento do influxo de leucócitos e, assim, da concentração de NOS e suas atividades (33).

Diversos agentes podem ser utilizados na tentativa de relaxar a cérvix. Farmacologicamente, são quimiocinas como a interleucina, análogos da prostaglandina e ON. A NOS é encontrada na cérvix de ratos, cobaias e suínos e tem sua concentração elevada durante o parto. Momento esse onde a cérvix se encontra aberta, podendo a NOS interferir na abertura e fechamento cervical mediada pelos leucócitos, situação semelhante às cadelas com piometra. As mudanças observadas na cérvix de suínos após administração de nitroprussiato de sódio assemelham-se àquelas após maturação fisiológica normal ao nascimento, com influxo de monócitos e granulócitos (18).

Pesquisas recentes estão investigando a ação do sistema óxido nítrico sintetase/óxido nítrico. Esse sistema parece estar associado à regulação do miométrio e da cérvix durante a gestação e o parto das mulheres. Estudos com ratos demonstraram que a atividade do óxido nítrico sintetase/óxido nítrico está associada à latência uterina. Previamente ao amadurecimento cervical, a atividade é baixa e, em seguida, aumenta no momento do trabalho de parto, sendo associada ao relaxamento da cérvix. O sistema óxido nítrico sintetase/óxido nítrico é a via final na indução de mudanças químicas associadas à maturação cervical (33).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A piometra é uma doença frequente nas cadelas e, a despeito de décadas de pesquisa, ainda são necessários estudos utilizando ferramentas mais sofisticadas e grupos de animais em fases hormonais bem definidas, a fim de compreender melhor sua etiologia e os mecanismos de abertura e fechamento cervical. Há um consenso de que as lesões são resultados de uma interação hormonal e participação bacteriana, mas apesar dos vários estudos sobre o tema, clinicamente, a síndrome piometra ainda representa um desafio para a maioria dos profissionais. A abertura cervical mediada por fármacos poderia facilitar o tratamento de animais portadores de piometra fechada, tornando o acesso ao útero mais seguro. Estudos sobre o uso do aglepristone para abertura cervical em cadelas com piometra já foram conduzidos, mas seu mecanismo de atuação ainda não está completamente esclarecido, mesmo sendo de comum consenso entre os autores sua colaboração na abertura cervical. A eliminação da secreção uterina por meio de drogas ecbólicas e antibioticoterapia poderia ser o tratamento de escolha para os animais com finalidade reprodutiva. O relaxamento cervical, independente do ciclo estral, poderia também facilitar a realização de exames citológicos e histopatológicos do endométrio para diagnóstico de processos inflamatórios e neoplásicos. Portanto, o entendimento de mecanismos de abertura cervical poderia auxiliar na clínica reprodutiva.

Após revisão sobre o tema, fatores como os agentes etiológicos causadores da infecção uterina, o infiltrado inflamatório, a concentração sérica de progesterona e estrógeno e os receptores de estrógenos não parecem estar envolvidos nos mecanismos de abertura e fechamento cervical. Em contra partida, os receptores de progesterona e os fatores envolvidos na degradação e remodelamento dos colágenos, tais como prostaglandinas, interleucinas e óxido nítrico parecem interferir na abertura cervical.

REFERÊNCIAS

1. Weiss RR, Calomeno MA, Sousa RS, Briersdorf SM, Muradás P. Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela. *Arch Vet Sci.* 2004;9(2):81-7.
2. Goericke-Pesch S, Schmidt B, Failing K, Wehrend A. Changes in the histomorphology of the canine cervix through the oestrus cycle. *Theriogenology.* 2010;74(6):1075-81.
3. Hagman R, Reezigt BJ, Ledin HB, Karlstam E. Blood lactate levels in 31 female dogs with pyometra. *Acta Vet Scand.* 2009;51(2):11-9.
4. Dow C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Vet Rec.* 1957;69:1409-15.
5. Dow C. The cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Vet Rec.* 1958;70:1102-8.

6. Sandholm M, Vasenius H, Kivisto AK. Pathogenesis of canine pyometra. *J Am Vet Med Assoc.* 1975;167(11):1006-10.
7. Kempisty B, Bukowska D, Wozna M, Piotrowska H, Jackowska M, Zuraw A, et al. Endometritis and pyometra in bitches: a review. *Vet Med.* 2013;58(6):289-97.
8. Chatdarong K, Kunkitti P, Srisuwatanasagul S. P2 Distribution of Oestrogen Receptor and Progesterone Receptor and Leukocyte Infiltration in Canine Cervical Tissue. In: *Proceedings of 7th Chulalongkorn University Veterinary Science the Animal Company; 2008; Bangkok. Bangkok: Chulalongkorn University;2008. p.58.*
9. Oliveira KS. Cystic endometrial hyperplasia complex. *Acta Sci Vet.* 2007;35(2):270-2.
10. Oliveira PC, Lopes MD, Thomé HE, Balieiro JCC. Avaliação citológica, histológica e hormonal de cadelas normais e com complexo hiperplasia endometrial cística/piometra. *Vet Zootec.* 2008;15(1):150-9.
11. Smith FO. Canine pyometra. *Theriogenology.* 2006;66:610-2.
12. Sharif H, Hagman R, Wang L, Eriksson S. Elevation of serum thymidine kinase 1 in a bacterial infection: Canine piometra. *Theriogenology.* 2013;79:17-23.
13. Concannon PW. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci.* 2011;124:200-10.
14. Pretzer SD. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. *Theriogenology.* 2008;70:359-63.
15. De Bosschere H, Ducatelle R, Vermeirsch H, Van Den Broeck W. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected. *Theriogenology.* 2001;55:1509-19.
16. Ragni RA. Pyometra in a bitch following unusual sterilisation. *J Small Anim Pract.* 2005;46:39-40.
17. Junqueira LC, Carneiro J. *Aparelho Reprodutor Feminino.* In: *Histologia Básica.* 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1999. p:367-88.
18. Kelly RW. Inflammatory mediators and cervical ripening. *J Reprod Immunol.* 2002;57:217-24.
19. Tamada H, Kawata N, Kawate N, Inaba T, Kida K, Hatoya S, et al. Factors associated with patency of the uterine cervix in bitches with piometra. *Theriogenology.* 2012;93:1203-10.
20. De Cock H, Vermeirsch H, Ducatellel R, De Schepper J. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cystic-endometritis-pyometra complex in the bitch. *Theriogenology.* 1997;48:1035-47.

21. Volpato R. Análise clínica e imunoistoquímica do útero e cérvix de cadelas com o diagnóstico de piometra [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2011.
22. Oliveira NG, Koshiyam AMH, Scandura SC, Barros MA, Leme F, Torres MLM, et al. Uso de Aglepristone e cloprostenol no tratamento de piometra em cadela - Relato de Caso. In: VII Encontro Acadêmico de "Produção Científica" do Curso de Medicina Veterinária; 2006; São João da Boa Vista. São João da Boa Vista: Unifeob; 2006. p.328-33.
23. Ververidisa HN, Boscosa CM, Stefanakisb A, Saratsisa P, Stamoua AI, Krambovitisb E. Serum estradiol-17b, progesterone and espective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra *Theriogenology*. 2004;62:614-33.
24. Kunkitti P, Srisuwatanasagul S, Chatdarong K. Distribution of estrogen receptor alpha and progesterone receptor, and leukocyte infiltration in the cervix of cyclic bitches and those with pyometra. *Theriogenology*. 2011;75:979-87.
25. De Bosschere H, Ducatelle R, Tshamala M, Cory M. Changes in sex hormone receptors during administration of progesterone to prevent estrus in the bitch. *Theriogenology*. 2002;58:1209-17.
26. Volpato R, Martim I, Ramos RS, Tsunemi RH, Laufer-Amorim R, Lopes MD. Imunoistoquímica de útero e cérvix de cadelas com diagnóstico de piometra. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2012;64(5):1109-17.
27. Dhaliwal GK, England GCW, Noakes DE. Oestrogen and progesterone receptors in the uterine wall of bitches with cystic endometrial hyperplasia/pyometra. *Vet Rec*. 1999;145(16):455-7.
28. Chatdarong K, Linharattanaruksa P, Sirivaidyapong S, Srisuwatamasakul S. The proportions of Smooth Muscle and Collagen in the Cervical Tissue of Bitches during Various Stages of the Estrous Cycle and Bitches Developing. In: Proceedings 9th Chulalongkorn University Veterinary Science the Animal Company; 2010; Bangkok. Bangkok: Chulalongkorn University; 2010. p.129.
29. Hagman R, Kuhn I. Escherichia coli strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: Comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol*. 2002;84:143-53.
30. Coggan JA, Oliveira CM, Faustino M, Moreno AM, Von Sydow AC, Melville PA, et al. Microbiological study of intrauterine secretion from bitches with pyometra and research of virulence factors of Escherichia coli isolates. *Arq Instit Biol*. 2004;71 Suppl:1-749.
31. Bartoskova A, Vitasek R, Leva L, Faldyna M. Hysterectomy leads to fast improvement of haematological and immunological parameters in bitches with pyometra. *J Small Anim Pract*. 2007;48(10):564-8.
32. Volpato R, Reis MV, Rodrigues MMP, Tsunemi RH, Lopes MD. Infiltrado leucocitário em cérvix de cadelas com piometra aberta e fechada. In: Anais do XX CBRA; 2013; Uberlândia. Uberlândia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; 2013. p.171.

33. Goldberg AE. Role of various hormones in the process of cervical ripening [Internet]. New York: Medscape; 2013 [cited 2013 Mar 8]. Available from: <<http://emedicine.medscape.com/article/263311-overview#aw-2aab6b5>>
34. Nunes F, Rodrigues R, Meirinho M. Randomized comparison between intravaginal misoprostol and dinoprostone for cervical ripening and induction of labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181(3):626-9.
35. Barbas JP, Gonçalves SC, Marques CC, Horta AEM. Efeito da aplicação vaginal de agentes dilatadores do cérvix durante a fase folicular do ciclo em ovelhas. In: *Anais do III Congresso Ibérico de Reprodução Animal; 2001; Porto, Portugal.* Porto: Federação Ibérica de Reprodução Animal; 2001. p.299-307.
36. Bartoskova A, Turanek-Knotigova P, Matiasovic J, Oreskovic Z, Vicenova M, Stepanova H. γ δ T lymphocytes are recruited into the inflamed uterus of bitches suffering from piometra. *Vet J.* 2012;194(3):303-8.
37. Mensikova M, Stepanova H, Faldyna M. Interleukin-17 in veterinary animal species and its role in various diseases: A review. *Cytokine.* 2013;64(1):11-7.
38. Scurlock AM, Frazer LC, Andrews JRCW, O'Connell CM, Foote IP, Bailey SL. Interleukin-17 contributes to generation of Th1 immunity and neutrophil recruitment during *Chlamydia muridarum* genital tract infection but is not required for macrophage influx or normal resolution of infection. *Infect Immun.* 2011;79(3):1349-62.
39. Dixit VD, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim Reprod Sci.* 2001;65(1-2):1-16.
40. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411(2-3):217-30.
41. Hayashia KG, Hosoeb M, Takahashia T. Placental expression and localization of endothelin-1 system and nitric oxide synthases during bovine pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 2012;134(3-4):150-7.

Recebido em: 03/12/2013

Aceito em: 29/05/2015

PERSPECTIVAS DO USO DE MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE EQUINOS DE CORRIDA DA RAÇA QUARTO DE MILHA

Guilherme Luis Pereira^{1,2}

Inaê Cristina Regatieri²

Guilherme de Camargo Ferraz²

Antonio de Queiroz Neto²

Rogério Abdallah Curi³

RESUMO

A utilização de marcadores moleculares trouxe grande progresso ao melhoramento genético de espécies comerciais destinadas à produção, como bovinos, suínos e aves, principalmente com o aumento da acurácia de predição de valores genéticos e precocidade na seleção de animais superiores. Isto ocorreu por meio do uso de alguns poucos marcadores ligados a Locus de Características Quantitativas – QTL (Seleção Assistida por Marcadores) ou pela estimação de efeitos de milhares deles simultaneamente (Estudos de Ampla Associação do Genoma – GWAS ou Seleção Genômica – GS). Por outro lado, em outras espécies domésticas, incluindo os equinos, o emprego desta biotecnologia ainda é pouco explorado. Os primeiros estudos a identificar variantes genéticas ligadas a melhores desempenhos em corridas foram realizados recentemente na raça Puro-Sangue Inglês (PSI), resultando na implantação de testes genéticos que auxiliam criadores na seleção de animais com maior potencial genético. Esta revisão tem por objetivo descrever a atual situação dos marcadores moleculares aplicados à cavalos de corrida e as perspectivas do seu uso no melhoramento genético de equinos de corrida Quarto de Milha, raça de grande importância no mundo e também no Brasil.

Palavras-chave: cavalos, desempenho, gene candidato, QTL, SNPs.

PROSPECTS OF THE USE OF MOLECULAR MARKERS IN THE GENETIC BREEDING OF RACING QUARTER HORSES

ABSTRACT

The use of molecular markers has brought great progress to genetic breeding programs of commercial species aimed at production, such as cattle, pigs and poultry, especially with the increase of the accuracy of prediction of breeding values, allowing early selection of better animals. This occurred either through the use of a few markers linked to Locus of Quantitative Trait – QTL (marker-assisted selection) or the estimation of the effects of thousands of them simultaneously (Genome Wide Association Studies – GWAS or Genomic Selection – GS). However, in other domestic species, including equine, the use of this biotechnology remains underexplored. The first studies to identify genetic variants linked to better performance in races were performed with Thoroughbred horses, resulting in the implementation of genetic tests that assist breeders in selecting animals with greater genetic potential. The objective of this review was to describe the current status of molecular markers

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Botucatu, 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brasil

² Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp – Jaboticabal, 14884-900 Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

³ Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Universidade Estadual Paulista, 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brasil. rogcuri@fmvz.unesp.br, Tel: 55 14 3880-2984

applied to racehorses and prospects of their use in genetic improvement of racing Quarter Horses, an important breed in the world and also in Brazil.

Keywords: candidate gene, horse, performance, QTL, SNPs.

PERSPECTIVA DEL USO DE MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE EQUINOS DE CARRERAS DE LA RAZA CUARTO DE MILLA

RESUMEN

La utilización de marcadores moleculares trae gran progreso para el mejoramiento genético de especies comerciales destinadas a la producción, como bovinos, porcinos y aves, principalmente con el aumento de la precisión de predicciones de valores genéticos y rapidez en la selección de animales superiores. Esto ocurrió por medio del uso de algunos pocos marcadores ligados a Locus de Características Cuantitativas – QTL (Selección Asistida por Marcadores) o por la estimación de efectos de millones de ellos simultáneamente (Estudio de asociación del Genoma Completo – GWAS o asociación Genómica – GS). Sin embargo, en otras especies domésticas, incluyendo los equinos, el empleo de esta biotecnología aun es poco explorado. Los primeros estudios para identificar variantes genéticas ligadas a mejores desempeños en carreras fueron realizados recientemente en la raza Pura Sangre Ingles (PSI), resultando en la implantación de pruebas genéticas que auxilian a los criadores en la selección de animales con mayor potencial genético. Esta revisión tiene por objetivo describir la situación actual de los marcadores moleculares aplicados a los caballos de carrera y las perspectivas del uso en el mejoramiento genético de equinos de carrera Cuarto de Milla, raza de gran importancia en el mundo y también en Brasil.

Palabras clave: caballos, desempeño, gen candidato, QTL, SNPs.

INTRODUÇÃO

Nenhum outro animal doméstico desempenhou papel tão direto no desenvolvimento social e político da humanidade como o cavalo. Embora no início de sua domesticação tenham sido utilizados como fonte de matéria prima e alimentos, ao longo da história foram amplamente empregados como meio de transporte e no progresso agrícola. No século XX, com o desenvolvimento tecnológico das mais diversas áreas, grande parte do seu uso prático chegou ao fim, ficando restrito às regiões com baixo índice de desenvolvimento econômico. Contudo, os seres humanos mantiveram estreita relação com estes animais, criando-os para a prática de esportes, recreação, ou simplesmente por sua beleza física (1).

O uso de cavalos em práticas esportivas é o segmento mais lucrativo da equinocultura. Além das provas funcionais, as corridas movimentam grande volume de dinheiro devido às apostas, contratações, comércio de animais, etc. A pesquisa e a utilização de marcadores moleculares, seja por meio de painéis com alguns poucos ou milhares deles, tem trazido bons resultados no melhoramento genético de espécies comerciais de produção. Em equinos, a utilização desta biotecnologia ainda é restrita, com alguns estudos importantes realizados na raça Puro-Sangue Inglês (PSI). Tais estudos geraram alguns testes genéticos que visam auxiliar o processo de seleção de animais para desempenhos superiores em corridas.

Esta revisão tem como objetivos discorrer de modo sucinto a respeito da situação atual da equinocultura e do melhoramento genético de equinos no Brasil e no mundo, dos conceitos sobre marcadores moleculares e da prospecção destes para a seleção de animais superiores

para corrida na raça PSI, além da perspectiva de sua utilização em equinos da linhagem de corrida da raça Quarto de Milha, tendo em vista que os efeitos de polimorfismos de DNA sobre fenótipos são parâmetros intrínsecos de cada população, linhagem ou raça em determinado ambiente.

Equinos no Brasil e no Mundo

Atualmente há cerca de 60 milhões de cavalos no mundo, a maioria deles vivendo nas Américas, Ásia e alguns países da Europa. Os Estados Unidos é o país com maior contingente (aproximadamente 10,5 milhões), seguido da China (6,7 milhões), seguidos do México (pouco mais de 6 milhões), e Brasil (pouco menos de 6 milhões). Estes quatro países, conjuntamente, possuem cerca de 50% da população global de cavalos (2).

O impacto do agronegócio do cavalo no Brasil é bastante expressivo, tendo movimentado, em 2006, valor econômico superior a R\$ 7,5 bilhões ao ano e abrangendo cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (3). Neste sentido, considerando-se a estimativa de que o País possui 5.900.700 cabeças (4), constata-se que aproximadamente para cada dois cavalos há geração de um emprego.

A utilização de equinos na lida de rebanhos bovinos (aproximadamente cinco milhões) vem sendo o seguimento de maior destaque dentro do agronegócio do cavalo no Brasil, representando 52% da movimentação monetária e 78% dos empregos diretos gerados (3). Esta intensa relação tem feito os cavalos acompanharem os bovinos em seu deslocamento para as regiões Centro-Oeste e Norte do País.

Embora a utilização do cavalo na lida com bovinos seja marcante no contexto da equinocultura nacional, o seguimento que envolve os esportes equestres, acompanhando tendência mundial, tem crescido acentuadamente nos últimos anos. Neste sentido, no período de 1999 a 2004 o número de eventos envolvendo as diversas modalidades equestres (salto, adestramento, enduro, concurso completo de equitação, etc.) cresceu 315% (3), ou seja, aumento médio de 15,3% ao ano. Além da utilização do cavalo na lida da fazenda e nas provas equestres, a tendência de sua utilização para lazer vem aumentando significativamente. O cavalo também é utilizado na equoterapia, modalidade disponível há milhares de anos e, agora, reconhecida como de grande eficácia para o tratamento de inúmeros males físicos, psíquicos e comportamentais.

Apesar de certa polêmica envolvendo o tema, principalmente pelo papel histórico que o cavalo desenvolveu junto ao homem, o consumo da carne e de derivados de cavalos é comum em varias partes do mundo, sendo em alguns países da Ásia Central a principal fonte de proteína animal. Em muitos outros países da Europa, América do Sul e Ásia constitui parte significativa das tradições culinárias (5).

Melhoramento genético de equinos

Em relação a outras espécies de exploração zootécnica, as pesquisas na área de melhoramento genético são proporcionalmente menores em equinos, no mundo todo. No Brasil, em particular, dada à grandeza de sua tropa, esta distância é ainda mais evidente. Embora algumas pesquisas publicadas em cavalos envolvam a área de melhoramento genético, ainda não existem, efetivamente, programas consistentes de seleção nas diferentes raças criadas no Brasil. Neste sentido, pequenos grupos de pesquisadores ligados às universidades e institutos de pesquisa têm trabalhado na área, especialmente em relação a aspectos conservacionistas em raças nacionais ou quantitativos de caracteres de interesse econômico em raças nacionais e importadas.

Assim como em outras partes do mundo, não existem programas concretos de melhoramento genético para animais das raças PSI e Quarto de Milha criados no Brasil. O que se faz atualmente, em razão da disponibilidade de informações fenotípicas e de

genealogia aprofundada, é a estimação de parâmetros genéticos populacionais tais como herdabilidade e correlações genéticas de características de interesse. Desta forma, o que se tem, tanto no PSI como no Quarto de Milha, é a seleção dos indivíduos com base em premiação, desempenho em corridas e genealogia. Mas é possível que, como ferramenta de aperfeiçoamento, a seleção genética feita nestes moldes já não seja mais eficaz. Basta considerar os resultados de provas tradicionais do turfe, um tipo de corrida disputada apenas pela raça PSI, como o Kentucky Derby, nos Estados Unidos, ou o Grande Prêmio Brasil, para constatar que há 50 anos não são registradas melhoras significativas nos tempos dos vencedores. Algo mais refinado em relação à seleção e ao melhoramento genético de equinos vem sendo feito na Europa, com a utilização de modelos estatísticos mais adequados para a obtenção de valores genéticos individuais, como o BLUP (*Best Linear Unbiased Prediction*) (6). Esta alternativa tem sido aplicada na criação de cavalos destinados a esportes olímpicos como o *cross country*, o adestramento e o salto.

Apesar de os criadores de cavalos para esporte cada vez mais almejam animais geneticamente superiores, capazes de apresentar melhor desempenho nas provas, existe um distanciamento entre pesquisa e aplicação prática que impede a realização de programas consistentes e contínuos de seleção. Embora tenha ocorrido um aumento significativo das publicações em diversas áreas relacionadas aos equinos (7), o melhoramento genético dos cavalos atletas continua sendo complexo, fazendo com que a obtenção de um animal superior para as provas equestres ou mesmo para o trabalho seja tarefa difícil. A maior causa desta dificuldade é a baixa herdabilidade do desempenho atlético e os valores de correlações genéticas existentes entre as características mais almejadas nos cavalos (8,9,10). A baixa herdabilidade do desempenho atlético em equinos pode ser um argumento a mais para a utilização de novas ferramentas disponíveis para a seleção e o melhoramento genético, tais como os marcadores de DNA ou marcadores moleculares, os quais serão apresentados mais a frente.

Também existem dificuldades e contratempos ao se pesquisar melhoramento genético de cavalos no Brasil que são inerentes à espécie equina como: baixos índices reprodutivos; altos intervalos de geração e parto; baixo número de progênies por parição e longo período de gestação, e em função de aspectos operacionais como: informações escassas e imprecisas de caracteres reprodutivos, comportamentais e de desempenho em grande parte das raças; baixa receptividade das associações de criadores às tecnologias reprodutivas; relação superficial entre órgãos técnicos e criadores.

A questão da aversão às biotécnicas reprodutivas tais como: inseminação artificial; transferência de embriões e fertilização *in vitro*, atualmente restrita de forma mais intensa à raça PSI, é outro fator que pode ter limitado o melhoramento genético pela não utilização massiva de animais superiores. Além de cultural, a não utilização destas técnicas está relacionada ao pequeno tamanho efetivo das populações de muitas raças de equinos, principalmente a PSI. Uma situação contrária, ou seja, de utilização destas ferramentas poderia aumentar ainda mais os níveis de consanguinidade e conseqüentemente de homozigose na raça, promovendo o surgimento de doenças genéticas e traços recessivos indesejados.

Também existem algumas vantagens relativas à pesquisa na área de melhoramento genético de cavalos, utilizando-se princípios de genética quantitativa. A profundidade da genealogia na maioria das raças é alta, características de desempenho geralmente podem ser medidas em ambos os sexos, repetidamente, e em períodos de tempo relativamente curtos.

Com relação à produção dos cavalos atletas, o Brasil aperfeiçoou desde o manejo, pastagem e reprodução até a genética, mesmo que muitas vezes de maneira empírica. Esta preocupação com o melhoramento da qualidade do plantel brasileiro vem ganhando força e a

sua consequência pode ser a expansão da equinocultura no país, observada principalmente por meio do crescimento do número de eventos esportivos.

Fisiologia e metabolismo do músculo estriado esquelético

Muitos dos processos fisiológicos ligados ao ótimo desempenho atlético têm mostrado alguns aspectos semelhantes em humanos e equinos (11,12). Para equinos de competição, o sucesso em provas depende principalmente da capacidade metabólica do animal para converter energia química em mecânica. Componentes destes processos energéticos incluem a taxa, a eficiência e a interação dos metabolismos creatina-fosfato, anaeróbio e aeróbio nos músculos e do fornecimento de glicose e oxigênio por meio do sistema cardiovascular. Cavalos desempenham diferentes tipos de exercício físico, variando de predominantemente anaeróbio para predominantemente aeróbio. Corridas curtas de cavalos da raça Quarto de Milha (201 a 503 metros) são predominantemente anaeróbias, já algumas classes de exercícios de arena, como apartação e rédeas, modalidades desempenhadas pela linhagem de trabalho da raça Quarto de Milha, intercalam curtos turnos de exercício anaeróbio com maiores períodos de atividade aeróbia (13). Por sua vez, as corridas longas da raça PSI (800 a 3.218 metros) são predominantemente aeróbias.

O músculo esquelético nos mamíferos demonstra alto grau de plasticidade e se adapta rapidamente a diferentes exercícios. Esta adaptação é devido às respostas ao tipo de contração, intensidade dos exercícios, nível de oxigênio e, principalmente, aos exercícios ou treinamentos envolvendo resistência muscular (14,12). Os tipos de fibras musculares podem ser classificados com base na fonte primária de energia (oxidativa/aeróbia ou glicolítica/anaeróbia) e velocidade de contração. Em mamíferos são classificadas como; tipo I ou oxidativa (contração lenta) e; tipo II ou glicolítica (contração rápida), podendo a última ser dividida em diferentes subclasses como, tipos IIA, IIB, IIC e IIM (15). Levando-se em consideração o tipo de treinamento físico, as concentrações do oxigênio no tecido muscular podem variar e atuar sobre a regulação de seu metabolismo (oxidativo ou glicolítico). Em humanos foi constatado que treinamentos de resistência elevam o volume de oxigênio máximo (VO_2 max) e o metabolismo aeróbio. Estes efeitos são provocados, em parte, por meio de um aumento de até 40% na densidade de capilares e de até 30% no número de mitocôndrias musculares, juntamente com o aumento da proporção das fibras oxidativas (16).

Adenosina trifosfato (ATP) é a fonte de energia utilizada pelas fibras musculares para contração. Durante o trabalho muscular, o ATP é hidrolisado em adenosina difosfato (ADP) por meio da enzima miosina-ATPase, liberando fosfato inorgânico e energia para a contração. A adenosina difosfato (ADP) resultante da hidrólise do ATP é fosforilada a partir de creatina-fosfato, com função de manter os níveis de ATP celular constantes. Para a obtenção de ATP, o animal pode utilizar os estoques de creatina-fosfato ou do glicogênio muscular (metabolismos anaeróbio e aeróbio). Entretanto, como o estoque de creatina-fosfato no músculo é muito pequeno, essa via metabólica de produção de ATP predomina apenas nos primeiros segundos – explosão (15).

Quando o músculo utiliza o glicogênio de reserva para obtenção de energia sob a forma de ATP, a glicose é convertida em piruvato e durante o metabolismo aeróbio, o piruvato é oxidado pelo oxigênio molecular, em CO_2 e H_2O . A via aeróbia produz grande quantidade de ATP, porém leva longo tempo para isso devido às numerosas reações que ocorrem na glicólise. Em exercícios físicos de curto tempo e maiores intensidade, os animais necessitam de produção mais rápida de ATP e o oxigênio fornecido aos tecidos musculares pode não ser suficiente para oxidar totalmente o piruvato (17). Nestes casos, a produção de energia acontece predominantemente pelo metabolismo anaeróbio e a glicose é convertida em piruvato e depois em lactato pela via da fermentação láctica, obtendo ATP sem recorrer ao oxigênio (18). Desta forma, a via glicolítica anaeróbia gera acúmulo de lactato e de prótons

H⁺ no músculo e no sangue, o que constitui a principal causa da fadiga e da dor muscular (19,20).

Outra possível causa da fadiga seria a incapacidade de utilização do fosfato inorgânico (Pi) formado na hidrólise do ATP em ADP para a restauração do ATP. Desta forma, o Pi se acumula no citoplasma na forma de KH₂PO₄, que, por sua acidez, atua diretamente sobre as proteínas contráteis, diminuindo sua capacidade de desenvolver tensão dentro dos sarcômeros (15).

Marcadores moleculares

Marcador molecular é toda e qualquer variação oriunda de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (regiões expressas ou não do genoma). Ao se verificar que esses marcadores segregam de acordo com as leis mendelianas para características monogênicas, ou apresentam distribuições compatíveis com as esperadas para características poligênicas, marcador molecular é também definido como marcador genético (21). Neste sentido, marcadores de DNA são um tipo de marcador molecular e, na maior parte das vezes, marcadores genéticos. Do ponto de vista molecular ocorrem três tipos principais de variações na molécula de DNA, as regiões repetitivas (minissatélites e microssatélites), as inserções e deleções (InDels) e as alterações de uma única base (Polimorfismos de Nucleotídeo Único - SNPs).

Marcadores moleculares permitem que os genótipos dos indivíduos sejam determinados em muitos loci (22), possibilitando que parâmetros genético-populacionais como frequências alélicas e genotípicas sejam estimados. Estas informações permitem a comparação de frequências entre populações e revelam diferenças em suas composições genéticas que podem contribuir para variações fenotípicas (23). Isto é possível tendo em vista que ao longo da domesticação e formação das raças, os animais domésticos experimentaram a seleção natural e a artificial. Estas pressões de seleção levaram ao aumento da frequência de algumas mutações em regiões específicas do genoma, as quais tornaram os indivíduos mais adaptados ou deram a eles características favoráveis com base na demanda humana. Ao mesmo tempo, outros polimorfismos apresentaram diminuição de frequência ou eliminação completa.

Entretanto, para a identificação das regiões do DNA responsáveis por características de interesse, recorreu-se durante muito tempo a algumas estratégias diferentes, como a localização de QTL pela análise de regiões microssatélites do maior número possível de indivíduos de grandes famílias, originárias de acasalamentos direcionados (24). Porém, a aplicação dessa ferramenta esbarrava na dificuldade de se constituir famílias para o estudo, no elevado custo para a manutenção dos animais, principalmente em espécies, cujo intervalo entre gerações é grande (caso dos bovinos e equinos), e na quantidade de trabalho e tempo necessários para a coleta dos dados moleculares. Além disso, após a identificação do QTL ainda havia longo caminho a percorrer até a descoberta dos genes e polimorfismos diretamente implicados com o fenótipo.

Metodologia alternativa para minimizar essas dificuldades foi a busca de genes candidatos principais, onde o objetivo é estudar os mecanismos fisiológicos envolvidos com a manifestação das características de interesse, na tentativa de pesquisar variações de genes específicos entre indivíduos que apresentam fenótipos diferentes (25). A estratégia do gene candidato tem como maior vantagem o fato de não ser obrigatório a genotipagem de grande número de indivíduos de grandes famílias originados de acasalamentos direcionados, uma vez que, a princípio, espera-se que o polimorfismo estudado seja determinante direto de variação fenotípica, ou seja, causal ou em forte desequilíbrio de ligação com o polimorfismo causal. Entretanto, polimorfismos que segregam e se encontram associados a características interessantes em animais de certa linhagem ou raça, podem não segregam em animais de outras linhagens ou raças da mesma espécie.

Além disso, resultados positivos de associação entre polimorfismos e características de interesse obtidos para populações de animais de uma linhagem ou raça não são imediatamente aplicáveis à populações de linhagens ou raças diferentes, uma vez que efeitos de substituição de alelos de um polimorfismo são parâmetros intrínsecos de cada população ou raça em determinado ambiente (26). Assim sendo, antes de transpor marcadores das populações onde foram identificados para a comercialização, é fundamental a comprovação dos seus efeitos sobre as características de interesse em diferentes raças e ambientes em processo conhecido como validação.

Marcadores SNPs

À medida que as sequências de nucleotídeos dos genomas foram sendo desvendadas, característica observada foi o grande número de variações de ponto (um nucleotídeo) encontradas ao se comparar segmentos correspondentes do mesmo genoma. As mais comuns ocorrem, aproximadamente, a cada 600 bases e são denominadas polimorfismos de nucleotídeos únicos ou SNPs.

As substituições mais frequentes observadas no DNA envolvem bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, são trocas entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas pirimidinas (C/T ou T/C) e são denominadas transições. As transversões são substituições de uma purina por uma pirimidina ou o contrário. Essas alterações podem ser provocadas por erros de incorporação de bases durante a replicação do DNA ou em outros casos, são causadas por agentes ambientais. Caso essas alterações ocorram em células germinativas, sejam transmitidas às gerações seguintes e se fixem na população a uma frequência mínima de 1%, passam a ser denominadas de polimorfismos (27).

Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, bem como em espaços intergênicos, sem função determinada. Em regiões codificadoras, quando resultam em substituição de aminoácido na sequência proteica, são denominados não sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. Nesses casos, pode haver modificações estruturais e funcionais na proteína. Embora SNPs sinônimos não alterem a sequência proteica, eles podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro e conseqüentemente, afetar a quantidade de proteína produzida. Esta também pode ser afetada quando ocorrem alterações nas regiões não traduzidas do RNA mensageiro (5' UTR e 3' UTR). Além disso, polimorfismos gênicos podem promover processamentos alternativos, geração ou supressão de códons de terminação, alteração nos códons de iniciação da tradução e alterações no padrão de expressão de genes quando a troca de bases ocorre em sequências promotoras (28).

Recentemente, polimorfismos intrônicos ganharam importância pelo fato de não mais poderem ser descartados como possíveis responsáveis diretos por alterações fenotípicas. RNAs não codificantes transcritos a partir de regiões de introns (micro-RNAs) estão envolvidos em diferentes processos biológicos tais como os controles transcricional e pós-transcricional da expressão gênica (29).

Estudos em humanos e em espécies de interesse zootécnico mostraram a ocorrência de milhões SNPs ao longo do genoma de um indivíduo (*Human Genome Project Information, The SNP Consortium LTD, Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, EquCab2.0 SNP Collection*). Além dos marcadores SNP serem abundantes, suas bases moleculares permitem sua distribuição homogênea pelo genoma (30).

Marcadores moleculares no melhoramento genético de equinos

Apesar da maior dificuldade de aplicação de ferramentas moleculares em estudos visando a seleção e o melhoramento genético de equinos em função, entre outros, da

disponibilidade de animais, as informações referentes ao genoma da espécie vêm experimentando expansão sem precedentes.

De acordo com Chowdhary (31), entre os maiores destaques provenientes da análise do genoma de equinos estão o seu sequenciamento completo (EquCab2.0) e, a partir deste, a identificação de 750 mil SNPs com o sequenciamento inicial da égua “Twilight” da raça Puro-Sangue Inglês, e outros 400 mil detectados em equinos de sete diferentes raças. Dados provenientes do sequenciamento de uma égua Quarto de Milha revelaram que dos 3,15 milhões de SNPs descobertos, 2,8 milhões são SNPs novos, incluindo 18 mil SNPs não sinônimos e 2,6 mil complexos (32). Como resultado destes desenvolvimentos e da aplicação dos chips de SNPs, pode ser antecipado que, nos próximos anos, as bases genéticas de importantes características monogênicas serão analisadas com maior acurácia e rapidez e as características complexas/multigênicas de interesse terão seus componentes genéticos dissecados.

Ao longo dos últimos nove ou dez anos, muitas equipes de pesquisa ao redor do mundo analisaram grande quantidade de genes candidatos individuais buscando a identificação de marcadores potencialmente associados à características de interesse em cavalos tais como: cor da pelagem (33,34,35); doenças (36,37,38); resistência a doenças (39,40,41); reprodução e fertilidade (42,43); comportamento e temperamento (44,45); e desempenho (14,46-50).

Projetado para permitir a identificação de regiões genômicas modificadas pela seleção e a identificação de SNPs e genes que contribuem para características de interesse nas principais raças de equinos criadas atualmente no mundo, o *Equine SNP50 BeadChip* da empresa Illumina (Illumina Inc., USA) constitui-se em poderosa plataforma para a seleção e o melhoramento genético da espécie, habilitando pesquisadores da área a conduzir vasta gama de experimentos em que a aplicação da genotipagem de polimorfismos de DNA é necessária. Já em sua segunda geração, o novo SNP *chip* equino (*Equine SNP70 BeadChip*; Illumina Inc., EUA) possui aproximadamente 65 mil SNPs, dos quais 19 mil são novos marcadores e 45 mil foram validados no *Equine SNP50 BeadChip*.

Em um primeiro momento, esses chips serviram com sucesso, principalmente, à identificação de SNPs, regiões genômicas e genes relacionados à importantes doenças e síndromes que acometem determinadas raças tais como lordose (51,52), osteocondrose (53,54), neuropatia laringeal recorrente (55), nanismo (56) e síndrome do potro lavanda (57). Mais recentemente, características complexas relacionadas ao desempenho em provas esportivas e aptidões específicas tem sido alvo de pesquisas por meio de chips de SNPs para equinos (12,58-60).

Detalhamento da raça Quarto de Milha

O cavalo da raça Quarto de Milha teve sua formação na América do Norte, a partir do século XVII, com a introdução de equinos de origem árabe e turca, trazidos por colonizadores europeus. Contudo, seu maior desenvolvimento ocorreu com a ocupação do oeste Norte Americano, devido à necessidade de cavalos robustos e versáteis, com aptidão à sela e à tração, visto a dificuldade de se manter plantel variado de animais para atender as diversas necessidades. A população desses equinos cresceu e em 1940 fundou-se a *American Quarter Horse Association* (AQHA), primeira envolvendo a raça. Atualmente conta com aproximadamente cinco milhões de cavalos registrados em todo o mundo (61).

No Brasil existem aproximadamente 424.000 animais registrados junto a Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Quarto de Milha (ABQM), desde sua fundação em 1969, tendo impacto relevante no agronegócio nacional do cavalo, visto que estão avaliados em aproximadamente US\$ 827,3 milhões, ocupando área de 593,2 mil hectares de propriedades rurais. A mão de obra empregada diretamente é bastante significativa, oferecendo 318 mil empregos diretos (média de quatro funcionários por criador ou proprietário) (61).

Dentro da raça Quarto de Milha há subdivisão em diferentes segmentos de aptidão, provenientes de distintos objetivos de seleção, consideradas linhagens, entre as quais: a de trabalho, a de conformação e a de corrida. A linhagem de trabalho destina-se às provas de caráter funcional, explorando habilidades como agilidade e obediência, características consideradas de grande importância no manejo do gado a campo. Dentro desta linhagem sempre houve grande interesse na produção de cavalos com *cow sense* superior (62). *Cow sense*, ou habilidade de trabalhar com o gado bovino, pode ser medida pela capacidade do cavalo em cercar o gado e apartar do rebanho um animal escolhido (63), com pouca assistência do cavaleiro (62). Acredita-se que o cavalo deve ter a habilidade de perceber e antecipar os movimentos do bovino para ser um bom apartador (64). A linhagem de conformação enfatiza a morfologia do padrão racial.

A linhagem de corrida explora a aptidão dos animais quanto à velocidade em pistas retas e de curta distância. Destacadamente equinos desta raça tem melhor desempenho em corridas de curtas distâncias do que qualquer outra raça (61), sendo os mais velozes cavalos do mundo e um dos mais velozes dentre todos os animais, podendo alcançar velocidades de até 88 km/h e percorrer, a partir de uma posição estática, $\frac{1}{4}$ de milha (402 metros, aproximadamente) em menos de 21 segundos (65). Apesar do efetivo de animais ser relativamente menor nesta que nas demais linhagens, sua importância econômica é substancial, não somente por gerar renda por meio de premiações e apostas (US\$ 2,5 milhões 3 (3), mas também pelo elevado custo gerado na manutenção destes animais dentro desta modalidade esportiva (entre R\$ 800,00 e R\$ 1.400,00, em média mensal, excluindo-se medicamentos e procedimentos veterinários).

Não há estudos de melhoramento genético no Brasil envolvendo a linhagem de trabalho, basicamente devido à escassez/inconsistência de informação de desempenho armazenada atualmente no *Stud Book* da ABQM. No entanto, desde 2009, esta associação vem de modo regular, registrando dados de desempenho de todos os animais participantes de provas por ela homologadas, o que permitirá no curto prazo, a realização de pesquisas. Pelos mesmos motivos, que os da linhagem de trabalho, não há pesquisas na área de melhoramento envolvendo a linhagem de conformação. Uma vez que apenas na linhagem de corrida encontram-se disponíveis dados de desempenho em quantidade e consistência suficientes, somente nela foram realizadas pesquisas envolvendo melhoramento genético (66,67,68).

Um atributo seletivo para o Quarto de Milha de corrida é a pontuação conhecida como Índice de Velocidade (IV), que é obtido durante sua campanha, com o intuito de classificar o desempenho do animal. Seu cálculo está relacionado com o tempo obtido na corrida ajustando-se para diferentes distâncias percorridas. Os animais com IV superior acabam sendo valorizados economicamente e são utilizados mais intensamente na reprodução e, portanto, interferindo na formação da linhagem. O IV foi criado nas corridas da raça Quarto de Milha com o intuito de permitir comparação de desempenhos entre os animais em diferentes condições (distâncias, hipódromo, clima, país) (69).

Cada hipódromo tem sua própria tabela de IV para cada distância, que é elaborada a partir da média das três vitórias mais rápidas (três melhores tempos) para cada um dos três últimos anos consecutivos, sendo que o valor da média destes nove tempos equivalerá ao IV igual a 100 (68). Os pontos de IV são inteiros e variam de acordo com o tempo, ao nível de centésimos de segundo, seguindo ajustes em acordo com a distância percorrida. A tabela de IV (Tabela 1) faz a conversão do tempo em pontos do IV com ajustes pelas distâncias. Como exemplo, nas distâncias de 365 metros (m), 402 m e 503 m, a cada 4 centésimos de segundo, a mais ou a menos, que um animal obtém, em relação ao tempo que representa o índice de velocidade igual a 100, diminui-se ou acresce-se um ponto neste índice. Assim, ao se considerar que a média das nove vitórias (IV = 100) foi de 22 segundos para os 402 m, o animal cujo tempo se situe entre 22,01 e 22,04 terá IV igual a 99, se o tempo estiver entre

22,05 e 22,08 o IV será 98, e assim por diante. Por outro lado, se o tempo estiver entre 21,96 e 21,99 será acrescido em um ponto, obtendo o IV 101, e os que tiverem tempo entre 21,92 e 21,95 seus IVs serão de 102 pontos, e assim sucessivamente. Para distâncias menores, o cálculo do IV é realizado considerando-se menor variação do tempo, Em 320 m se alternará a cada 3 e 4 centésimos de segundo, iniciando com 3 centésimos de segundo, enquanto que em 301 m e 275 m será de 3 centésimos de segundo e em 228 m será a cada 2 centésimos de segundo. Esta tabela é válida para animais que correm carregando peso mínimo de 53 Kg. Para aqueles com peso inferior, deve-se acrescentar 5 centésimos de segundo ao seu tempo, para cada quilo a menos.

Tabela 1. Variação para pontuação do índice de velocidade (IV), de acordo com a distância (metros), tendo como ponto de partida os tempos referentes ao IV igual a 100.

	Tempo (Centésimos de segundo)			
	4	3 e 4*	3	2
Distância(m)	365	320	275	228
	402		301	
	503			

* alternados, iniciando-se com três centésimos.

Com o intuito de se estabelecer um registro para desempenhos, criou-se o Registro de Mérito em Corridas (Tabela 2), atribuído aos animais com IV igual ou superior a 80 pontos.

Tabela 2. Classificação do registro de mérito de acordo com o IV.

	Índice de Velocidade (pontos)		
	80 a 90	91 a 99	>100
Registro de mérito	AA (Double A)	AAA (Triple A)	AAAT (Top Triple A)

Genes candidatos para desempenho em equinos de corrida

O potencial atlético em mamíferos é influenciado por complexa inter-relação entre conjunto de genes e fatores ambientais (49). A contribuição genética para potencial atlético em humanos é bem documentada, no qual mais de 220 genes já foram descritos (70).

Embora seja provável que o desempenho atlético em equinos também seja influenciado por grande número de genes, até o momento poucas variantes genéticas foram relacionadas à característica, exclusivamente em animais Puro-Sangue Inglês, entre estas SNPs nos genes *myostatin* – *MSTN* (14,58,59,71), *piruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4* – *PDK4* (72,49), *creatine kinase, muscle* – *CKM* e *cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2* – *COX4I2* (50). Recentemente, um SNP do gene *doublesex and mab-3 related transcription factor 3* – *DMRT3* equino foi associado de forma altamente significativa à marcha em equinos de diversas raças. Esta mutação afeta consideravelmente a coordenação motora ligada à locomoção (73).

Além dos genes mencionados acima, outros dois podem ser considerados de importância para o aprofundamento de estudos em razão do papel fisiológico desempenhado por seus produtos. Os genes *monocarboxylate transporter 1* – *MCT1* e *cluster of differentiation 147* – *CD147* estão relacionados ao controle e retardamento da fadiga muscular (74). Neste sentido, o estudo de polimorfismos em suas sequências podem providenciar informações e ferramentas genéticas úteis para a seleção de equinos atletas.

MSTN – myostatin

O *MSTN* é membro da família de genes *transforming growth factor-beta* (TGF- β), é expresso no tecido muscular esquelético e atua como regulador negativo do crescimento da massa muscular. Várias mutações ou polimorfismos têm sido identificados no *MSTN* em bovinos (75,76), ovinos (77), camundongos (78) e mais recentemente em humanos (79), entre outros, resultando em fenótipos de hiperplasia e hipetrofia muscular (dupla musculatura).

Polimorfismo do *MSTN* em cães de corrida da raça Whippet mostrou-se associado a aumento da massa muscular e também à habilidade atlética (80). Binns et al. (59) utilizaram 189 cavalos Puro-Sangue Inglês vencedores de corrida na América do Norte e identificaram por meio chips de SNPs (*Illumina Equine SNP50 BeadChip*) dois polimorfismos (BIEC2-417274 e BIEC2-417495) associados a distância ótima de corrida. Análises de bioinformática revelaram que estes SNPs com maiores significâncias estatísticas e localizados no cromossomo equino 18 (ECA18), são vizinhos ao loco do gene *MSTN*. Em pesquisa paralela e publicada no mesmo ano, Hill et al. (58), também utilizando o *Equine SNP50 BeadChip* em 118 cavalos elite Puro-Sangue Inglês de corrida, divergentes em relação à distância ótima de corrida, e identificaram o SNP BIEC2-417495 (localizado no cromossomo 18 a aproximadamente 690Kb do gene *MSTN*), como o mais significativamente relacionado à característica.

Ao analisar o gene *MSTN* equino em amostra de 148 cavalos Puro-Sangue Inglês registrados, Hill et al. (14) identificaram um novo polimorfismo (g.66493737C>T) fortemente associado à distância ótima de corrida, para o qual animais de genótipo CC mostraram-se adequados para corridas de distâncias curtas (rápidas), animais de genótipo CT para corridas de distâncias médias e animais de genótipo TT para corridas de distâncias longas (resistência). Segundo os mesmos autores, testes comparativos de associação demonstraram consistentemente o SNP g.66493737C>T como variante superior na predição de aptidão para distâncias em cavalos de corrida da raça Puro-Sangue Inglês.

De fato, em estudo recente, envolvendo 33 raças (n = 744), foi encontrada na região do gene *MSTN* assinatura de seleção em equinos da raça Paint Horse e Quarto de Milha (81). Com sequenciamento e análise histológica demonstrou-se que o SNP em questão (g.66493737C>T), localizado no intron 1, e uma variação altamente correlacionada (95%) da região promotora (SINE de 227 pb), estavam significativamente associados ao volume da fibra muscular do tipo IIX (81). Atualmente a genotipagem deste SNP é empregada de forma comercial para auxiliar a predição da distância ótima de corrida em equinos da raça Puro-Sangue Inglês.

DMRT3 - doublesex and mab-3 related transcription factor 3

A família de genes *DMRT* (*DMRT1-8*) codifica vasta gama de fatores de transcrição cuja função vem sendo bastante estudada em vertebrados e invertebrados. Seus padrões de expressão não estão restritos somente ao desenvolvimento das gônadas, mas também a outros processos de desenvolvimento, envolvendo principalmente o sistema nervoso central (82).

O *DMRT3* codifica importante fator de transcrição na configuração de circuitos da medula espinhal, controlando o movimento em vertebrados. Está envolvido na especificação neuronal, incluindo a subdivisão de células da medula espinhal, e o desenvolvimento de uma rede de neurônios responsável pela coordenação do sistema locomotor que controla os movimentos dos membros. Por meio do silenciamento deste gene (*DMRT3*^{-/-}) em camundongos observou-se menor gasto de tempo de nado e espasmos frequentes nos movimentos dos membros, quando colocados em água, padrão este que não foi observado nos camundongos controle. Em esteira, camundongos *DMRT3*^{-/-} tiveram maior dificuldade de movimentos em alta velocidade e apresentaram passadas significativamente mais longas,

creditada ao maior tempo no movimento de extensão. Heterozigotos não diferiram dos controles (73).

Dentre os equinos, naturalmente ocorrem três padrões de locomoção, em ordem crescente de velocidade: o passo; o trote e o galope. Alguns cavalos podem alternar o padrão intermediário de velocidade pela marcha, sendo, conseqüentemente, incapazes de desenvolver grande velocidade. Em estudo de associação ampla do genoma (GWAS), um marcador foi significativamente associado com o padrão de movimento em equinos da raça Islandesa. Após sequenciamento da região foi identificado um SNP (g.22999655C>A) no gene *DMRT3* significativamente associado ao tipo de andamento (73).

Em análise inicial com diversas raças, a frequência do alelo A foi próxima a 100% em raças marchadoras, com altas frequências de homozigotos AA, e 0% em raças não marchadoras (73). Posteriormente, mostrou-se a ocorrência do alelo A, ainda que em baixa frequência, em raças não marchadoras (83). De acordo com Andersson et al. (73), a ocorrência da variante A do SNP g.22999655C>A cria *stop códon* prematuro que resulta em proteína de 300 aminoácidos contra 438 do tipo selvagem (alelo C). Assim, o alelo mutante (A) do gene *DMRT3* pode se mostrar prejudicial para raças de velocidade, diminuindo o desempenho de cavalos em corridas.

CKM - creatine kinase, muscle

O gene *CKM*, mapeado no cromossomo equino 10 (ECA10), codifica um tipo muscular de isoenzima da creatina quinase encontrada exclusivamente no músculo estriado e envolvida em processos celulares energéticos, como a fosforilação da creatina formando a creatina fosfatada (creatina-fosfato). Durante exercício, camundongos *CKM* nocaute mostraram falta de explosão muscular, mas mantiveram as condições normais de força absoluta (84). Polimorfismos no gene *CKM* humano têm sido associados com aumento na resistência cardio-respiratória assim como ao consumo máximo de oxigênio após vinte semanas de treinamento (85).

O transcriptoma do músculo esquelético de cavalos Puro-Sangue Inglês mostrou que o mRNA do *CKM* é o mais abundantemente expresso, representando 6,9% de todo o transcrito (48). Por outro lado, estudos indicaram que o mRNA do *CKM* compõe aproximadamente 1% do transcriptoma músculo esquelético humano (86). A expressão muito elevada do mRNA do *CKM* no músculo esquelético equino em comparação ao humano é indicativo da importância do produto do gene no fenótipo atlético altamente adaptado do Puro-Sangue Inglês. Em apoio a estes dados, transcritos do gene *CKM* equino aumentaram significativamente após quatro horas de exercício em esteira e após período de 10 meses de treino (87).

O fator de regulação interferon (IRF-1) é um fator de transcrição mediado por oxigênio envolvido na biogênese e metabolismo mitocondrial. Em humanos foi demonstrado ser significativamente ativado após um período de persistência no exercício físico (88). O SNP g.15884567A>G do gene *CKM* equino, localizado no intron 4, rompe um suposto sítio de ligação do IRF-1 (50). Ao investigar o efeito do polimorfismo g.15884567A>G do gene *CKM* sobre a retrospectiva de desempenho em corridas em 148 animais da raça Puro-Sangue Inglês, Gu et al. (50) encontraram o alelo A como favorável para a característica, sendo que indivíduos de genótipos AA e AG apresentaram-se superiores em relação aos GG. Os autores ressaltaram, entretanto, que tais resultados preliminares de associação entre o polimorfismo do *CKM* e performance em corrida deve ser validado e outras populações de equinos antes que a aplicação da informação possa ser utilizada.

PDK4 - piruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4

A expressão do gene *PDK4*, localizado no cromossomo equino 4 (ECA4), é coordenada pelo co-ativador transcricional PGC-1 α (89), o qual tem sido identificado como um dos

fatores críticos no controle da adaptação ao exercício (90). O PGC-1 α é um regulador chave do metabolismo energético que atua regulando a sensibilidade à insulina pelo controle do transporte de glicose, mediando a angiogênese induzida por exercício (91) e coordenando a biogênese mitocondrial (92).

A regulação da utilização da glicose é rigidamente controlada pela captação de glicose pelos seus transportadores, pela taxa de fluxo glicolítico e pela conversão de piruvato em acetil-CoA na mitocôndria por meio da função catalisadora do complexo piruvato desidrogenase (PDC). O passo crítico limitante da velocidade de oxidação da glicose é a regulação da montagem do PDC, que é controlado pela piruvato desidrogenase quinase (PDK). A PDK bloqueia a formação do PDC, resultando na beta-oxidação de ácidos graxos para acetil-CoA como substrato para a fosforilação oxidativa. A oxidação de ácidos graxos é altamente eficaz na geração de ATP e é controlada pela expressão de *PDK4* no músculo esquelético durante e após o exercício (93).

Eivers et al. (87) identificaram aumento significativo da expressão do mRNA do gene *PDK4* (+7,4-fold) em músculos esqueléticos de equinos durante a recuperação do exercício físico. Considerando-se que variação na expressão gênica pode ser fortemente influenciada por variações genéticas estruturais, Hill et al. (49) investigaram a possibilidade de associações entre SNPs identificados no *PDK4* e desempenho em corrida de cavalos da raça Puro-Sangue Inglês. Encontraram o SNP g.38973231A>G fortemente associado com a característica, sendo que indivíduos de genótipo AA e AG apresentaram maior *handicap rating* em relação aos de genótipo GG.

COX4I2 - cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2

Citocromo c oxidase (COX) é uma enzima multi-subunidade (Complexo IV) que catalisa a transferência de elétrons do citocromo c reduzido para o oxigênio na respiração mitocondrial. COX é um dímero no qual cada monômero é composto de 13 subunidades, das quais três são codificados pelo genoma mitocondrial (COX1, 2 e 3). O COX4, codificado pelo DNA nuclear, é responsável pela regulação e montagem das subunidades mitocondriais codificadas no interior da membrana da organela e tem sido associado com o seu volume. O COX4 compreende duas isoformas (COX4-1 e COX4-2) codificadas pelos genes *COX4I1* e *COX4I2*, os quais são diferencialmente regulados em ambientes de normóxia (oxigênio normal) e hipóxia (falta de oxigênio) (94). Em ambientes com oxigênio normal, o gene *COX4I1* é preferencialmente transcrito. Em ambientes de oxigênio limitado o regulador principal de resposta à hipoxia, HIF-1 (fator induzível de hipoxia 1), ativa a transcrição dos genes *COX4I2* e *LON* mitocondrial, o que inibe a expressão do *COX4I1*. Neste sentido, tem sido proposto que a regulação ambiental de COX4-2 pode aumentar a eficiência da respiração celular (94).

Gu et al. (50) identificaram uma fraca, mas significativa, associação entre o SNP intrônico g.22684390C>T do gene *COX4I2* de equinos, localizado no cromossomo 22 (ECA22), e a retrospectiva de desempenho em corridas utilizando 278 animais da raça Puro-Sangue Inglês. Animais homocigotos para o alelo menos frequente (T) foram fenotipicamente superiores aos de genótipo CC e CT. Ainda de acordo com estes autores, o SNP g.22684390C>T pode ser o causador direto de variação na característica uma vez que rompe um possível sítio de ligação de um elemento de resposta a glicocorticóides (GRE).

MCT1 – monocarboxylate transporter 1 e CD147 – cluster of differentiation 147

Proteínas transmembrana denominadas transportadores monocarboxilatos auxiliam o organismo na adaptação ao estresse fisiológico causado pelo exercício físico. Entre 14 diferentes isoformas, a proteína transportadora monocarboxilato tipo 1 (MCT1), codificada

pelo gene de mesmo nome (*MCT1*), é uma das mais encontradas em mamíferos e localiza-se no músculo e na membrana dos eritrócitos (95).

Esses transportadores facilitam o transporte de lactato e outros substratos como o piruvato, o acetoacetato e o β -hidroxibutirato, para dentro e fora das células por meio da membrana plasmática. Este transporte é realizado juntamente com um próton e é controlado pelo gradiente de íon hidrogênio, portanto, não requer utilização de ATP (96). Quando são realizados exercícios intensos, a concentração de lactato no plasma e nas células vermelhas do sangue varia consideravelmente e pode aumentar muito, tornando os animais extremamente propensos à fadiga muscular. Essa variação da concentração ocorre devido à taxa de influxo de lactato para dentro das hemácias, o que é dependente da atividade das proteínas MCTs. A proteína MCT1 tem como principal função transportar os íons H^+ e lactato do plasma para dentro dos eritrócitos, mantendo assim, a homeostase ácido/base e retardando a acidose sistêmica e a fadiga.

Os transportadores MCTs necessitam de proteína acessória para sua correta localização e ação na membrana plasmática. A proteína acessória da isoforma MCT1 é uma glicoproteína integrante da membrana plasmática, pertencente à superfamília das imunoglobulinas, denominada *cluster of differentiation 147* - CD147 (74), codificada por gene de mesmo nome (*CD147*). Segundo Wilson et al. (97), a proteína acessória é necessária para a manutenção da atividade catalítica dos MCTs e para sua translocação para a membrana plasmática. Segundo Koho et al. (95), a alta ou baixa capacidade de transporte de lactato é mais intensamente regulada pela maior ou menor expressão de CD147 do que pela expressão de MCT1.

Reeben et al. (47) buscaram sequências dos genes *MCT1* e *CD147* em cavalos da raça Standardbred, para examinar as diferenças entre os equinos que possuíam maior e menor capacidade de transporte de lactato em suas hemácias. Os autores encontraram polimorfismos no gene da proteína MCT1 (Lys547Gln – AY457175.1:c1573A>C) e da proteína CD147 (Met125Val – EF564280.1:c389A>G), no entanto, aparentemente não relacionados com a atividade de transporte de lactato. Mykkänen et al. (98) estudaram os mesmos polimorfismos descritos acima em equinos saudáveis e com miopatia, nas raças Standardbred e Finnhorses, mas não conseguiram associar claramente as mutações com os sinais fenotípicos nos animais.

Para definir as bases genéticas da expressão das proteínas MCT1 e CD147 e para determinar se a baixa expressão dessas proteínas era devido à variantes no DNA, Koho et al. (99) buscaram por polimorfismos em equinos das raças Standardbred, Finnhorse, Warmblood e Icelandic. Os autores encontraram dois SNPs na sequência do *MCT1*: Val432Ile: 1498G>A e Lys547Gln: 1573A>C, que não explicaram a variação da expressão gênica. No gene da proteína CD147, foram encontrados os SNPs não sinônimos Met125Val: 389A>G e Ile51Val: 168A>G, além de mais dois SNPs (888G>C e 990C>T) na região 3' UTR do gene (responsável por regular a estabilidade do RNAm). Neste caso, os autores concluíram que os SNPs nos nucleotídeos 389 e 990 apresentaram efeito sobre a expressão do complexo de transporte MCT1 – CD147.

Estudos de genes candidatos para desempenho em corridas no Quarto de Milha

Resultados obtidos a partir do sequenciamento da região do SNP g.66493737C>T do gene *MSTN* mostrou o alelo C fixado na linhagem de corrida da raça Quarto de Milha (n = 30). Dessa forma, a realização de teste associação para verificação de sua relação com desempenho em corridas não foi possível (100). Em Hill et al. (49), a genotipagem de 35 cavalos Quarto de Milha também mostrou a alta ocorrência do alelo C (0,9) e do genótipo CC (CC 0,83; CT 0,14; TT 0,03). Estes resultados demonstram que este alelo vem sofrendo pressão de seleção na raça e confirmam a sua relação com corridas de curtas distâncias.

Na análise de 296 animais de corrida e 68 de trabalho da raça Quarto de Milha, as diferenças de frequências alélicas e genotípicas se mostraram significativas para os SNPs

g.38973231A>G do gene *PDK4* e g.22684390C>T do gene *COX4I2* entre as duas linhagens. O mesmo não foi observado quando estas frequências foram comparadas entre fenótipos extremos de corrida. Também não houve efeitos significativos no teste de associação entre os alelos dos dois polimorfismos e o Índice de Velocidade (IV) (Pereira et al., dados não publicados). Estes resultados sugerem que os alelos dos genes *PDK4* e *COX4I2*, relacionados com melhor desempenho em corridas na raça PSI, estejam relacionados à adaptações benéficas do metabolismo aeróbico e, dessa forma, tenham papéis secundários no desempenho em corridas curtas, predominantemente anaeróbicas, na raça Quarto de Milha.

O SNP g.15884567A>G do gene *CKM* mostrou-se polimórfico em amostra da raça Quarto de Milha, porém não foram encontradas associações significativas de suas variantes com as linhagens de corrida (n = 40) e de trabalho (n = 20), ou com grupos de fenótipos contrastantes para desempenho dentro da linhagem de corrida (n = 20 de IV inferiores, n = 20 de IV superiores) (Pereira et al., dados não publicados). Com base em sua importância no metabolismo energético muscular em exercícios intensos e curtos, era esperado que variações do gene *CKM* apresentassem papel relevante sobre o desempenho em corridas na raça Quarto de Milha, ou ainda que estivessem associadas à diferentes linhagens dentro da raça. Entretanto, a sua relação com o metabolismo aeróbico via sua interação com o IRF-1 pode explicar a associação não significativa deste SNP com o desempenho em corridas em Quartos de Milha, visto que a ocorrência deste tipo de metabolismo é praticamente inexistente em provas desta raça.

O SNP g.22999655C>A do gene *DMRT3* foi genotipado em 60 animais da raça Quarto de Milha, sendo 40 da linhagem de corrida e 20 da de trabalho. Exceto por dois animais heterozigotos (CA) no grupo de animais de corrida com IV inferiores (n = 20) e um na linhagem de trabalho (n = 20), todos foram homozigotos (CC). A aparição do alelo da marcha (A) do gene *DMRT3* apenas em animais Quarto de Milha de corrida de IV inferior e de trabalho indica a possibilidade de esta alteração afetar consideravelmente o desempenho em corridas (100).

Resultados de trabalho realizado por Regatieri et al. (101) mostraram o alelo A do polimorfismo do gene *MCT1* (AY457175.1:c1573A>C – Lys547Gln) praticamente fixado na raça Quarto de Milha (n = 40), com apenas um animal heterozigoto (AC). De maneira semelhante, a genotipagem do polimorfismo do gene *CD147* (EF564280.1:c168T>C ou A>G – Ile51Val) mostrou o alelo A fixado na raça de origem americana. Desta forma, não foi possível determinar a influência dos alelos destes polimorfismos sobre o transporte de lactado do plasma para hemácias e sobre o desempenho atlético em corridas da raça Quarto de Milha.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Da mesma forma que para a maior parte das características de importância econômica, o desempenho em corridas dos equinos Quarto de Milha deve ser governado por grande número de genes, localizados em regiões cromossômicas denominadas Loci de Características Quantitativas (QTL).

Embora marcadores de DNA já sejam utilizados para predição de distâncias ótimas e desempenhos superiores em corridas para a raça Puro-Sangue Inglês, esses marcadores não têm os mesmos efeitos em diferentes raças de igual propósito (corrida). Esta afirmação pode ser mantida ainda que se considere a linhagem de corrida da raça Quarto de Milha, a qual possui influência genética de PSIs que correm distâncias curtas.

Considerando ambas as informações acima, a realização de estudo amplo de associação do genoma (GWAS) em animais Quarto de Milha de corrida será de grande interesse para a descoberta e utilização de marcadores genéticos específicos para a seleção de indivíduos superiores e para programas de melhoramento genético nesse segmento da raça.

REFERÊNCIAS

- 1 Bowling AT, Ruvinsky A. Genetics of Horse. Oxon, UK: CAB International; 2000.
- 2 Food and Agriculture Organization. The Global Livestock Production and Health Atlas (GLiPHA) [Internet]. Rome: FAO; 2011 [cited 2011 Nov 20]. Available from: <http://kids.fao.org/glipha/>.
- 3 Lima RAS, Shiota R, Barros GSC. Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo no Brasil. Piracicaba: CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - ESALQ/USP; 2006.
- 4 Food and Agriculture Organization. The horse, the wheel and language [Internet]. Rome: FAO; 2006 [cited 2008 Oct 4]. Available from: <http://www.fao.org/>.
- 5 Anthony DW. The horse, the wheel and language. Princeton: Princeton University Press; 2008. p.199-220.
- 6 Arnason T. Bright future for research in horse breeding! J Anim Breed Genet. 2013;130:167-9.
- 7 Almeida FQ, Silva VP. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. Rev Bras Zootec. 2010;39:119-29.
- 8 Koenen EPC, Van Veldhuizen AE, Brascampa EW. Genetic parameters of linear scored conformation traits and their relation to dressage and show-jumping performance in the Dutch Warmblood Riding Horse population. Liv Prod Sci. 1995;43:85-94.
- 9 Wallin L, Strandberg E, Philipsson J. Genetic correlations between field test results of Swedish Warmblood Riding Horses as 4-year-olds and life time performance results in dressage and show jumping. Liv Prod Sci. 2003;82:61-71.
- 10 Bokor A, Blouin C, Langlois B, Stefler J. Genetic parameters of racing merit of Thoroughbred horses in steeplechase races. Ital J Anim Sci. 2005;4:43-5.
- 11 Dias RG, Pereira AC, Negrão CE, Krieger JE. Polimorfismos genéticos determinantes da performance física em atletas de elite. Rev Bras Med Esp. 2007;13:211-6.
- 12 Schröder W, Klostermann A, Stock KF, Distl O. A genome-wide association study for quantitative trait loci of show-jumping in Hanoverian Warmblood horses. Anim Genet. 2012;43:392-400.
- 13 Freeman DW. Physical conditioning of horses. Stillwater, Okla: Oklahoma State University, Division of Agricultural Sciences and Natural Resources; 2013.
- 14 Hill EM, Gu J, Eivers SS, Fonseca RG, McGiveny BA, Govindarajan P, et al. A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in Thoroughbred Horses. PLoS One. 2010;5:1-6.

15. Breazile JE. Fisiologia do Músculo Esquelético. In: Swenson MJ, Reece WO. Fisiologia dos animais domésticos. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1996. p.777-93.
16. Hoppeler H, Howald H, Conley K, Lindstedt SL, Claassen H, Vock P, et al. Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1985;59:320-7.
17. Ferraz GC, Teixeira Neto AR, Lacerda Neto JC, Pereira MC, Queiroz Neto A. Respostas ao exercício de intensidade crescente em equinos: alterações na glicose, insulina e lactato. *Cienc Anim Bras.* 2009;10:1334-40.
18. Nelson DL, COX MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* New York, NY: WH Freeman and Company; 2005.
19. Fitts RH. Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol Rev.* 1994;74:49-94.
20. Hogan MC, Gladden LB, Kurdak SS, Poole DC. Increased [lactate] in working dog muscle reduces tension development independent of pH. *Med Sci Sports Exerc.* 1995;27:371-7.
21. Ferreira ME, Grattapalia D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa-Cenargen; 1998.
22. O'Brien SJ, Graves JA. Report of the committee on comparative gene mapping. *Cytogenet Cell Genet.* 1990;55:406-33.
23. Moody DE, Pomp D, Newman S, MacNeil MD. Characterization of DNA polymorphisms in three populations of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line 1 Herefords. *J Anim Sci.* 1996;74:1784-93.
24. Haley CS. Livestock QTLs - bringing home the bacon? *Trends Genet.* 1995;11:488-92.
25. Womack JE. The goals and status of the bovine gene map. *J Dairy Sci.* 1993;76:1199-203.
26. Regitano LCA. Importância da genética molecular para o melhoramento de ruminantes. In: Anais do V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal; 2004; Pirassununga/SP. Pirassununga/SP; 2004.
27. Kwok PY, Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol Med Today.* 1999;5:538-43.
28. Guimarães PEM, Costa MCR. SNPs: Sutis diferenças de um código. *Biotechnologia Cienc Desenvolvimento.* 2002;26:24-7.
29. Nakaya HI, Amaral PP, Louro R, Lopes A, Fachel AA, Moreira YB, et al. Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. *Genome Biol.* 2007;8:R43.

30. Caetano AR. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *Rev Bras Zootec.* 2009;38:64-71.
31. Chowdhary BP. *Equine genomics*. Iowa, EUA: John Wiley & Sons, Inc; 2013.
32. Doan R, Cohen ND, Sawyer J, Ghaffari N, Johnson CD, Dindot SV. Whole-genome sequencing and genetic variant analysis of a Quarter Horse mare. *BMC Genomics.* 2012;13:78.
33. Brunberg E, Andersson L, Cothran G, Sandberg K, Mikko S, Lindgren G. A missense mutation in PMEL17 is associated with the Silver coat color in the horse. *BMC Genet.* 2006;7:46.
34. Rosengren PG, Golovko A, Sundstrom E. Positional identification of the grey coat color mutation in horse. In: 7th Dorothy Russell Havemeyer International Equine Genome Mapping Workshop; 2007; Tahoe City, CA, EUA. Tahoe City, CA, EUA; 2007.
35. Reissmann M, Bierwolf J, Brockmann GA. Two SNPs in the SILV gene are associated with silver coat colour in ponies. *Anim Genet.* 2007;38:1-6.
36. Hansen M1, Knorr C, Hall AJ, Broad TE, Brenig B. Sequence analysis of the equine SLC26A2 gene locus on chromosome 14q15-q21. *Cytogenet Genome Res.* 2007;118:55-62.
37. Tryon RC, White SD, Bannasch DL. Homozygosity mapping approach identifies a missense mutation in equine cyclophilin B (PPIB) associated with HERDA in the American Quarter Horse. *Genomics.* 2007;90:93-102.
38. Young AE, Bower LP, Affolter VK, De Cock HE, Ferraro GL, Bannasch DL. Evaluation of FOXC2 as a candidate gene for chronic progressive lymphedema in draft horses. *Vet J.* 2007;174:397-9.
39. Solberg OD, Jackson KA, Millon LV, Stott JL, Vandenplas ML, Moore JN, et al. Genomic characterization of equine interleukin-4 receptor alpha-chain (IL4R). *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;97:187-94.
40. Brown JJ, Ollier WE, Thomson W, Matthews JB, Carter SD, Binns M, et al. TNF-alpha SNP haplotype frequencies in equidae. *Tissue Antigens.* 2006;67:377-82.
41. Rios JJ, Perelygin AA, Long MT, Lear TL, Zharkikh AA, Brinton MA, et al. Characterization of the equine 2-5 oligoadenylate synthetase 1 (OAS1) and ribonuclease L (RNASEL) innate immunity genes. *BMC Genomics.* 2007;8:313.
42. Hamann H, Jude R, Sieme H, Mertens U, Töpfer-Petersen E, Distl O, et al. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Anim Genet.* 2007;38:259-64.
43. Giesecke K, Hamann H, Stock KF, Woehlke A, Sieme H, Distl O. Evaluation of SPATA1-associated markers for stallion fertility. *Anim Genet.* 2009;40:359-65.

44. Momozawa Y, Takeuchi Y, Tozaki T, Kikusui T, Hasegawa T, Raudsepp T, et al. Sequence, detection of polymorphisms and radiation hybrid mapping of the equine catechol-O-methyltransferase gene. *Anim Genet.* 2005;36:190.
45. Momozawa Y, Takeuchi Y, Tozaki T, Kikusui T, Hasegawa T, Raudsepp T, et al. Polymorphism identification, RH mapping, and association analysis with the anxiety trait of the equine serotonin transporter (SLC6A4) gene. *J Vet Med Sci.* 2006;68:619-21.
46. Hanzawa K, Lear TL, Piumi F, Bailey E. Mapping of equine potassium chloride co-transporter (SLC12A4) and amino acid transporter (SLC7A10) and preliminary studies on associations between SNPs from SLC12A4, SLC7A10 and SLC7A9 and osmotic fragility of erythrocytes. *Anim Genet.* 2002;33:455-9.
47. Reeben M, Koho NM, Raekallio M, Hyypä S, Pösö AR. MCT1 and CD147 gene polymorphisms in standardbred horses. *Equine Vet J Suppl.* 2006;36:322-5.
48. McGivney BA, McGettigan PA, Browne JA, Evans AC, Fonseca RG, Loftus BJ, et al. Characterization of the equine skeletal muscle transcriptome identifies novel functional responses to exercise training. *BMC Genomics.* 2010;11:398.
49. Hill EW, Gu J, McGivney BA, MacHugh DE. Targets of selection in the Thoroughbred genome contain exercise-relevant gene SNPs associated with elite racecourse performance. *Anim Genet.* 2010;41 Suppl 2:56-63.
50. Gu J, MacHugh DE, McGivney BA, Park SDE, Katz LM, Hill EM. Association of sequence variants in CKM (creatine kinase, muscle) and COX4I2 (cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2) genes with racing performance in Thoroughbred horses. *Equine Vet J.* 2010;42:569-75.
51. Cook D, Gallagher P, Bailey E. Illumina Equine SNP50 Bead Chip Investigation of Adolescent idiopathic lordosis among American Saddlebred Horses. *J Equine Vet Sci.* 2009;29:315-6.
52. Cook D, Gallagher P, Bailey E. Genetics of swayback in American Saddlebred horses. *Anim Genet.* 2010;41:64-71.
53. Lykkjen S, Dolvik NI, McCue ME, Rendahl AK, Mickelson JR, Roed KH. Genomewide association analysis of osteochondrosis of the tibiotarsal joint in Norwegian Standardbred trotters. *Anim Genet.* 2010;41:111-20.
54. Teyssèdre S, Dupuis MC, Guérin G, Schibler L, Denoix JM, Elsen JM, et al. Genome-wide association studies for osteochondrosis in French Trotters. *J Anim Sci.* 2012;90:45-53.
55. Dupuis MC, Zhang Z, Druet T, Denoix JM, Charlier C, Lekeux P, et al. Results of a haplotype-based GWAS for recurrent laryngeal neuropathy in the horse. *Mamm Genome.* 2011;22:613-20.
56. Eberth J, Swerczak T, Bailey E. Investigation of Dwarfism Among Miniature Horses using the Illumina Horse SNP50 Bead Chip. *J Equine Vet Sci.* 2009;29:315.

57. Brooks SA, Gabreski N, Miller D, Brisbin A, Brown HE, Streeter C. Whole-genome SNP association in the horse: Identification of a deletion in Myosin a responsible for Lavender Foal Syndrome. *PLoS Genet.* 2010;6:e1000909.
58. Hill EW, McGivney BA, Gu J, Whiston R, Machugh DEA. Genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses. *BMC Genomics.* 2010;11:1-10.
59. Binns MM, Boehler DA, Lambert DH. Identification of the myostatin locus (MSTN) as having a major effect on optimum racing distance in the Thoroughbred horse in the USA. *Anim Genet.* 2010;41:154-8.
60. Petersen JL, Mickelson JR, Rendahl AK, Valberg SJ, Andersson LS, Axelsson J, et al. Genome-Wide Analysis Reveals Selection for Important Traits in Domestic Horse Breeds. *PLoS Genet.* 2013;9:1-17.
61. Associação Brasileira dos criadores de cavalos Quarto de Milha. Quarto de milha: origem [Internet]. São Paulo; 2015 [cited 2015 Jan 15]. Available from: <http://www.abqm.com.br/a-raca/origem-qm>.
62. Ellersieck MR, Lock WE, Vogt DW, Aipperspach R. Genetic evaluation of cutting scores in horses. *J Equine Vet Sci.* 1985;5:287-9.
63. Hintz RL. Genetics performance in the horse. *J Equine Vet Sci.* 1980;51:582-94.
64. Wagoner DM. Equine genetics and selection procedures. Dallas: Equine Research Publications; 1978.
65. America's Horse Daily. All About the Racing American Quarter Horse [Internet]. Amarillo, TX: American Quarter Horse Association; 2013 [cited 2013 Nov 12]. Available from: <http://americashorsedaily.com/all-about-the-racing-american-quarter-horse/>.
66. Villela LCV, Mota MDS, Oliveira HN. Genetic parameters of racing performance traits of Quarter horses in Brazil. *J Anim Breed Genet.* 2002;4:229-34.
67. Mota MDS, Abrahão AR. Environmental factors affecting time in Quarter Horse races. *Arch Zootec.* 2004;53:95-8.
68. Corrêa MJM, Mota MDS. Genetic evaluation of performance traits in Brazilian Quarter Horse. *J Appl Genet.* 2007;48:145-51.
69. Evans JW. Horses: a guide to selection, care and enjoyment Freeman and Company. 2a ed. New York: WH Freeman; 1989.
70. Bray MS, Hagberg JM, Perusse L, Rankinen T, Roth SM, Wolfarth B, et al. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: The 2006-2007 update. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41:35-73.

71. Tozaki T, Miyake T, Kakoi H, Gawahara H, Sugita S, Hasegawa T, et al. A genome-wide association study for racing performances in Thoroughbreds clarifies a candidate region near the MSTN gene. *Anim Genet.* 2010;41:28-35.
72. Gu J, Orr N, Park SD, Katz LM, Sulimova G, Machugh DE, et al. A genome scan for positive selection in Thoroughbred horses. *PLoS One.* 2009;4:1-17.
73. Andersson LS, Larhammar M, Memic F, Wootz H, Schwochow D, Rubin CJ, et al. Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature.* 2012;488:642-6.
74. Gallagher SM, Castorino JJ, Wang D, Philp NJ. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer Res.* 2007;67:4182-9.
75. Grobet L, Martin LJR, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, et al. A deletion in the myostatin gene causes double-muscling in cattle. *Nat Genet.* 1997;17:71-4.
76. Kambadur R, Sharma M, Smith TPL, Bass JJ. Mutations in myostatin (GDF-8) in double muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 1997;7:910-6.
77. Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet.* 2006;38:813-8.
78. Nishi M, Yasue A, Nishimatu S, Nohno T, Yamaoka T, Itakura M, et al. A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293:247-51.
79. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med.* 2004;350:2682-8.
80. Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, et al. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet.* 2007;3:e79.
81. Petersen JL, Valberg SJ, Mickelson JR, McCue ME. Haplotype diversity in the equine myostatin gene with focus on variants associated with race distance propensity and muscle fiber type proportions. *Anim Genet.* 2014;45:827-35.
82. Hong CS, Park BY, Saint-Jeannet JP. The function of Dmrt genes in vertebrate development: It is not just about sex. *Dev Biol.* 2007;310:1-9.
83. Promerova M, Andersson LS, Juras R, Penedo MCT, Reissmann M, Tozaki T, et al. Worldwide frequency distribution of the 'Gait keeper' mutation in the DMRT3 gene. *Anim Genet.* 2014;45:274-82.
84. Van Deursen J, Heerschap A, Oerlemans F, Ruitenbeek W, Jap P, Laak H, et al. Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity. *Cell.* 1993;74:621-31.

85. Echegaray M, Rivera MA. Role of creatine kinase isoenzymes on muscular and cardiorespiratory endurance: genetic and molecular evidence. *Sports Med.* 2001;31:919-34.
86. Welle S, Bhatt K, Thornton CA. Inventory of high-abundance mRNAs in skeletal muscle of normal men. *Genome Res.* 1999;9:p506-13.
87. Eivers SS, Mcgivney BA, Fonseca RG, Machugh DE, Menson K, Park SD, et al. Alterations in oxidative gene expression in equine skeletal muscle following exercise and training. *Physiol Genomics.* 2010;40:83-93.
88. Mahoney DJ, Parise G, Melov S, Safdar A, Tarnopolsky MA. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB J.* 2005;19:1498-500.
89. Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguere V, Kelly DP. PGC-1 α coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERR α : a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol.* 2005;25:684-94.
90. Arany Z. PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;5:426-34.
91. Chinsomboon J, Ruas J, Gupta RK, Thom R, Shoag J, Rowe GC, et al. The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:21401-6.
92. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1147:321-34.
93. Pilegaard H, Neufer PD. Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise. *Proc Nutr Soc.* 2004;63:221-6.
94. Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell.* 2007;129:111-22.
95. Koho NM, Hyypä S, Pösö AR. Monocarboxylate transporters (MCT) as lactate carriers in equine muscle and red blood cells. *Equine Vet J Suppl.* 2006;36:354-8.
96. Merezhinskaya N, Fishbein WN. Monocarboxylate transporters: Past, present, and future. *Histol Histopathol.* 2009;24:243-64.
97. Wilson MC, Meredith D, Fox JE, Manoharan C, Davies AJ, Halestrap AP. Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *J Biol Chem.* 2005;280:27213-21.
98. Mykkänen AK, Koho NM, Reeben M, McGowan CM, Pösö AR. MCT1, MCT4 and CD147 gene polymorphisms in healthy horses and horses with myopathy. *Res Vet Sci.* 2011;913:473-7.

- 99 Koho NM, Mykkänen AK, Reeben M, Raekallio MR, Ilves M, Pösö AR. Sequence variations and two levels of MCT1 and CD147 expression in red blood cells and gluteus muscle of horses. *Gene*. 2012;491:65-70.
100. Pereira GL, Regitano LCA, Meira CT, Matteis R, Nadalini EC, Regatieri IC, et al. Variants of MSTN and DMRT3 genes in Quarter Horses. In: *Anais do 60º Congresso Brasileiro de Genética*; 2014; Guarujá/SP. Guarujá/SP; 2014.
101. Regatieri IC, Pereira GL, Curi RA, Ferraz GC, Queiroz-Neto A. SNPs of equine genes encoding MCT1 and CD147 proteins in Arabians and Quarter Horses. In: *Anais do 60º Congresso Brasileiro de Genética*; 2014; Guarujá/SP. Guarujá/SP; 2014.

Recebido em: 27/02/2015

Aceito em: 24/06/2015

INFESTAÇÃO POR *Ornithonyssus* spp. EM UM CRIATÓRIO DE PERIQUITOS AUSTRALIANOS

Danieli Brolo Martins¹
Joyce Rodrigues Lobo²
Laura Garcia Vila³
Jorge Stumpfs Diaz⁴

RESUMO

Conhecido popularmente como ácaro da pena, o *Ornithonyssus* spp. é um ácaro hematófago, sendo um dos principais ectoparasitos em avicultura. Este trabalho tem por objetivo reportar a ocorrência de infestação por *Ornithonyssus* spp. em um criatório de periquitos australianos, em que 50% dos animais vieram a óbito.

Palavras-chave: ácaro, anemia, *Melopsittacus undulatus*.

INFESTATION BY *Ornithonyssus* spp. IN A AUSTRALIAN BUDGERIGARS BREEDING PLACE

ABSTRACT

Popularly known as the feather mite, *Ornithonyssus* spp. is an haematophagous mite, being one of the major ectoparasite in the poultry industry. The aim of this study is to report the occurrence of a parasitic infestation by *Ornithonyssus* spp. in an Australian budgerigar breeding, where 50% of the animals came to death.

Keywords: mite, anemia, *Melopsittacus undulatus*.

INFESTACIÓN POR *Ornithonyssus* spp. EN UN CRIADERO DE PERIQUITOS AUSTRALIANOS

RESUMEN

Popularmente conocido como ácaro de las plumas, el *Ornithonyssus* spp. es un ácaro hematófago, que representa una de las principales plagas en avicultura. En este trabajo se relata la infestación parasitaria causada por *Ornithonyssus* spp. en un criadero de periquitos australianos, en que fallecieron el 50 % de los animales.

Palabras clave: ácaro, anemia, *Melopsittacus undulatus*.

¹ Professora Adjunta do Departamento de Medicina Veterinária, Área: Laboratório Clínico Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG), em Goiânia, GO. Contato principal para correspondência.

² Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Área: Laboratório Clínico Veterinário da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG), em Goiânia, GO.

³ Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Área de Clínica de Animais Silvestres da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG), em Goiânia, GO.

⁴ Centro de Ciências da Saúde, Área: Clínica de Animais Silvestres da Universidade de Cruz Alta, RS.

INTRODUÇÃO

Apesar da grande variedade de espécies de ácaros parasitas de aves, somente algumas delas são consideradas patogênicas, afetando diversas espécies de aves (1). O gênero *Ornithonyssus* consiste em ácaros hematófagos e apresentam uma ampla distribuição geográfica, principalmente na América do Norte, Europa e alguns países subtropicais.

A transmissão de *Ornithonyssus* spp. ocorre por contato direto e os sinais clínicos podem incluir dermatite, perda de peso e lesões nas penas e pele. Em situações de parasitoses intensas, estes ácaros podem produzir debilidade, anemia, prurido, diminuição do crescimento e óbito (2,3).

O presente relato tem por objetivo reportar a ocorrência de alta infestação parasitária por *Ornithonyssus* spp. em um criatório de periquitos australianos, que ocasionou um índice de mortalidade de 50%.

RELATO DE CASO

Duas aves foram trazidas para consulta por apresentar quadro agudo de prurido, caquexia, debilidade e dermatite. Outras aves do plantel, localizado na cidade de Cruz Alta (RS), também possuíam os mesmos sinais clínicos, com intensidade variável. Os sinais clínicos tiveram início há cerca de um mês, com óbitos esporádicos. No entanto, na última semana, o índice de mortalidade elevou-se consideravelmente, com duas a três aves mortas ao dia, totalizando desde o início do surto 50% de óbitos (25/50). Após o exame clínico, as médicas veterinárias responsáveis pelo atendimento apresentaram prurido intenso nos braços.

Segundo o proprietário, os animais se alimentavam com uma dieta constituída de grãos, própria para periquitos australianos. Não havia relato recente de entrada de novos periquitos na criação ou contato com outras espécies de aves. Nas proximidades do plantel, não havia alojamento de outras aves.

Foram colhidas amostras de sangue das duas aves, com a finalidade de pesquisar a presença de hemocitozoários e determinação do volume globular (VG). Também foi realizado exame parasitológico de pele, quando foi possível a visualização macroscópica de pequenos pontos móveis de coloração esbranquiçada. Após, tais estruturas foram colocadas entre lâmina e lamínula para observação em microscopia de luz.

Na pesquisa do esfregaço sanguíneo não foi encontrado nenhum tipo de hemocitozoário. Os valores de VG dos animais revelaram anemia. Já o exame parasitológico de pele, evidenciou presença de ácaros do gênero *Ornithonyssus* spp. .

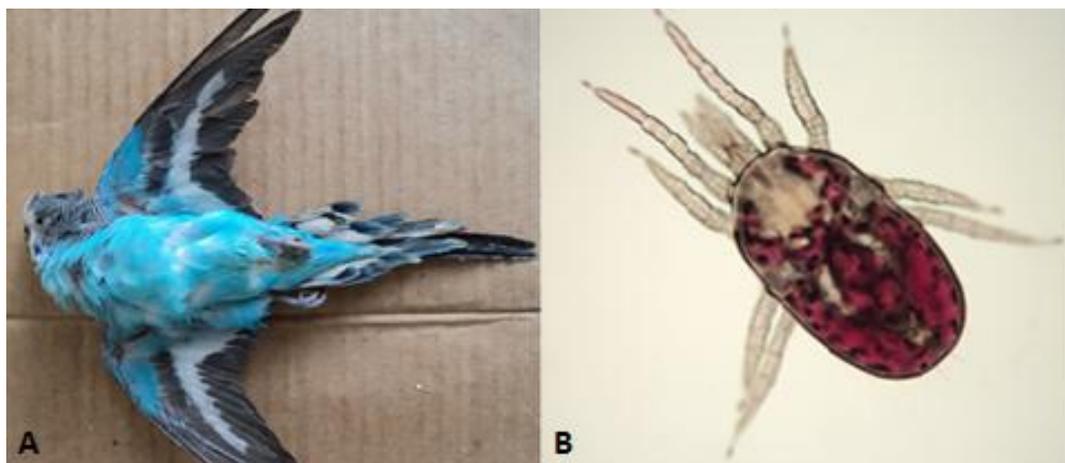


Figura 1. *Ornithonyssus* spp. em periquito australiano. **A:** Extrema fraqueza e debilidade da ave devido à alta infestação parasitária. **B:** Detecção do ácaro hematófago *Ornithonyssus* spp. após realização do exame parasitológico.

Após o diagnóstico de infestação por ácaros, instituiu-se o uso de ivermectina (Allax[®]), duas gotas (0,002 mg/ave) na região cervical da ave, dose única. Com esse tratamento, as aves demonstraram evidente melhora nos sinais de infestação já em uma semana. O local e fômites presentes no ambiente foram higienizados para evitar reinfestação. Vassoura de fogo foi passada nas paredes e piso, após a retirada dos animais do local.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os ácaros do gênero *Ornithonyssus* spp. estão adaptados a uma grande diversidade de espécies de aves, tanto domésticas como silvestres (4). No entanto, é mais frequente observar relatos desse parasita acometendo a avicultura industrial (5), sendo incomuns os relatos em psitacídeos.

Os principais sinais associados à sua infestação são irritação intensa, estresse, prurido, perda de peso, debilidade, anemia e lesão nas penas e pele, podendo chegar a ser letal sobretudo em animais jovens e de raças pequenas, como no presente caso (6). Os sinais dermatológicos de prurido e dermatite, aliados à informação epidemiológica de que os demais animais do plantel também apresentavam sintomatologia semelhante, levou à suspeita inicial de doença infectocontagiosa.

O diagnóstico de dermatites causadas por ácaros requer a detecção do parasita (7). O ciclo de vida de *Ornithonyssus* ocorre integralmente no hospedeiro, nas penas e na superfície da pele (8). As fêmeas adultas de *Ornithonyssus* spp. se diferenciam de *Dermanyssus* spp. por apresentar quelíceras alongadas com dígitos móveis no extremo; o escudo genito-ventral é menos largo arredondando-se mais abruptamente na área posterior e o escudo dorsal se estreita da mesma forma posteriormente (9), o que permitiu seu diagnóstico e sua diferenciação.

Ornithonyssus spp. é hematófago e potencialmente patogênico (2). Assim, é possível compreender a intensidade dos sinais clínicos apresentados pelas aves, uma vez que a severa anemia causada levou à mortalidade de 50% do plantel. O exame para detecção de hemoparasitoses descartou a possibilidade de infecção concomitante, o que poderia agravar ainda mais o quadro hematológico. Apesar das proteínas plasmáticas totais (PPT) não terem sido mensuradas nesse caso, é possível que os animais apresentassem hipoproteïnemia devido à espoliação pelos ectoparasitas, bem como, pela caquexia ocasionada pela alta infestação dos mesmos.

Quando um lote de aves apresenta um grau de infestação muito elevado, assim como observado no presente relato, o ácaro também pode ser encontrado nas fezes que ficam em baixo das gaiolas, nos ovos produzidos e infestando o trabalhador que cuida das aves, causando irritação, alergias e dermatites (10). O contato direto de aves parasitadas por ácaros de pele e penas facilita a transmissão destes para o homem (11). É relevante salientar que as médicas veterinárias também foram acometidas pelo parasita durante o atendimento clínico das aves, apresentando lesões eritematosas e pruriginosas. Tais lesões já foram previamente relatadas em humanos (7). Houve também contaminação do ambulatório clínico onde os animais foram atendidos.

Em criatórios de pássaros ornamentais, sempre que novas aves forem introduzidas é essencial que se faça quarentena em locais distantes dos criatórios. Deve-se ainda evitar a proximidade com outros pássaros, em caso de exposições ou competições (11). O proprietário dos animais não soube informar uma possível fonte de contaminação para os animais do relato. Contudo, foi alertado para condutas corretas de manejo e quarentena para o criatório.

O uso de ivermectina e moxidectina via intramuscular e intraperitonal em aves de postura demonstrou ser efetivo por curto período de tempo em altas doses (12). No presente relato, foi utilizada a ivermectina em dose terapêutica, uso tópico. A medicação demonstrou ser eficaz e segura para os pássaros ornamentais, sem manifestação de efeitos adversos.

Distintos patógenos com potencial zoonótico podem acometer pássaros ornamentais, bem como outras aves domésticas. Em particular os ácaros, como o *Ornithonyssus* spp., quando em infestações intensas, podem trazer prejuízos significativos aos criatórios, como anemia grave e morte das aves. Para evitar tais transtornos, medidas básicas de higiene pessoal e ambiental, controle de entrada de outros animais e de aves silvestres nos alojamentos e quarentena na introdução de novos pássaros podem ser adotadas, minimizando o risco de ocorrência de doenças.

Uma vez que no criatório alguns exemplares apresentem comportamentos incomuns, atenção deve ser requerida para que, rapidamente, sejam investigadas possíveis infestações por tais parasitas. Com essas medidas profiláticas e utilizando meios de diagnóstico adequados e indicação terapêutica eficaz, é possível o controle do *Ornithonyssus* spp. em criatórios de periquitos australianos.

REFERÊNCIAS

1. Pence DB. Acariasis. In: Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB. Parasitic diseases of wild birds. Ames: Wiley-Blackwell; 2008. p.527-36.
2. Zucca P, Delogu M. Enfermedades infecciosas y parasitarias. In: Samour J. Medicina aviária. 2a ed. Barcelona: Elsevier; 2010. p.309-92.
3. Doneley B. Avian medicine and surgery in practice: companion and aviary birds. Barcelona: Manson Publishing; 2010.
4. Knee W, Proctor H. Host records for *Ornithonyssus sylviarum* (Mesostigmata: Macronyssidae) from birds of North America (Canada, United States and Mexico). J Med Entomol. 2007;44:709-13.
5. Rezende LC, Cunha LM, Teixeira CM, Oliveira PR, Martins NRS. Mites affecting hen egg production – some considerations for Brazilian farms. Cienc Rural. 2013;43:1230-7.
6. Coles BH. Essentials of avian medicine and surgery. 3a ed. Ames: Blackwell Publishing; 2007.

7. Baumstark J, Beck W, Hofmann H. Outbreak of tropical rat mite (*Ornithonyssus bacoti*) dermatitis in a home for disabled persons. *Dermatology*. 2007;215:66-8.
8. Owen JP, Mullens BA. Influence of heat and vibration on the movement of the northern fowl mite (Acari: Macronyssidae). *J Med Entomol*. 2004;41:865-72.
9. Di Palma A, Giangaspero A, Cariero MA, Germinara GS. A gallery of the key characters to ease identification of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Gamasida: Dermanyssidae) and allow differentiation from *Ornithonyssus sylviarum* (Acari: Gamasida: Macronyssidae). *Parasit Vectors*. 2012;5:1-10.
10. Guimarães JH, Tucci EC, Barros-Battesti DM. Ectoparasitas de importância veterinária. São Paulo: Plêiade/FAPESP; 2001.
11. Boseret G, Losson B, Mainil JG, Thiry E, Saegerman C. Zoonoses in pet birds: review and perspectives. *Vet Res*. 2013;44:2-17.
12. Chauve C. The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Vet Parasitol*. 1998;79:239-45.

Recebido em: 03/04/2015

Aceito em: 25/06/2015

SLAFRAMINE INTOXICATION IN HORSE IN SANTA CATARINA STATE

Joandes Henrique Fonteque^{1*}
Anderson Fernando Souza²
Jackson Schade³
Thiago Rinaldi Muller¹
Nádia Cristine Weinert⁴

ABSTRACT

A case of slaframine toxicosis has been reported in a seven year-old, half-breed horse weighing 400Kg, used for traction. The animal demonstrated excessive salivation as the clinical sign and it was maintained on a pasture with red clover (*Trifolium pratense*). Upon the inspection of the pasture, observed leaves changes compatible with infection by *Rhizoctonia leguminicola*. The suspicion was slaframine toxicosis, and removal of the animal from the pasture with clover was indicated as treatment. The clinical sign stopped 24h after the feed had been withdrawn confirming the therapeutic diagnosis.

Keywords: ptialism, alimentation, clover, micotoxicoses.

INTOXICAÇÃO POR ESLAFRAMINA EM EQUINO NO ESTADO DE SANTA CATARINA**RESUMO**

Relata-se um caso de intoxicação por eslaframina em um equino, mestiço, macho, de sete anos de idade, pesando 400 kg, utilizado para tração. O animal apresentava como sinal clínico salivagem excessiva, permanecia em piquete formado de trevo vermelho (*Trifolium pratense*). À inspeção da pastagem foram observadas alterações foliares compatíveis com infecção por *Rhizoctonia leguminicola*. A suspeita foi intoxicação por eslaframina, e como tratamento o animal foi retirado da pastagem de trevo. Após 24h o animal cessou o sinal clínico de salivagem excessiva, confirmando o diagnóstico terapêutico.

Palavras-chave: ptialismo, alimentação, trevo, micotoxicose.

INTOXICACIÓN POR ESLAFRAMINA EN EQUINO EN LA PROVINCIA DE SANTA CATARINA**RESUMEN**

Se relata un caso de intoxicación por eslaframina en equino, mestizo, macho, de siete años de edad, con peso de 400 kg, de utilización para tracción. El animal presentaba como señal clínico salivación excesiva, permaneció en área con formación por el trébol rojo (*Trifolium*

¹ Professor Dr. do Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brasil. *Contato principal para correspondência. joandes.fonteque@udesc.br

² Acadêmico de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brasil.

³ Médico Veterinário Residente, Clínica Médica, Cirúrgica e Reprodução de Grandes Animais, Hospital Veterinário, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.

⁴ Acadêmica de Pós-graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brasil.

pratense). Por la inspección del pastaje fueron observadas alteraciones en las hojas, compatibles con infección por *Rhizoctonia leguminicola*. La sospecha fue intoxicación por eslaframina, como tratamiento se fue retirado el animal de la pastaje de trébol rojo. Después de 24h el animal cesó el señal clínico de salivación excesiva, cuando se confirma el diagnóstico terapéutico.

Palabras clave: ptialismo, alimentación, trébol, micotoxicosis.

INTRODUCTION

The slaframine is an indolizidine alkaloid produced by the fungus *Rhizoctonia leguminicola* (1), affecting various plants, more pertinently described herein those used as fodder for animal feed such as red clover (*Trifolium pratense*) white clover (*Trifolium repens* L.), alfalfa (*Medicago sativa*) (2,3) associated with high temperature and humidity conditions, and the fungus does not grow at temperatures below 25°C (4,5).

Slobbers syndrome affects horses and ruminants that ingest such plants, either raw or in the form of hay containing slaframine causing excessive salivation (drooling) which may extend from a few hours to days depending on the amount and individual sensitivity to the ingested compound. Other clinical signs may include anorexia, diarrhea, frequent urination, epiphora, colic and abortion syndrome (3). After hepatic metabolism, the slaframine is converted to its active form 6-ketomina with acetylcholine similar structure, with parasympathomimetic effect on exocrine glands, particularly the salivary glands and the pancreas due to its high affinity for muscarinic receptors of type 3 (6,7,8).

Clinical signs are shown in a short period and animals usually recover shortly after ingestion, it may cause some distress to the owners when faced with their animals affected by the mycotoxin (1,4). The diagnosis can be therapeutic, restricting access to contaminated food, by the identification of *Rhizoctonia leguminicola* or slaframine compound in the suspected food or by slaframine detection in plasma samples of affected animals (1).

This study aims to report the poisoning slaframine in an equine after ingestion of red clover in southern Brazil.

CASE REPORT

A seven year-old gelding crossbreed horse weighing 400Kg, used for traction, member of the Extension Program "Amigo do Carroceiro" was attended at Veterinary Hospital of Agroveterinary Sciences Center (CAV), from Santa Catarina State University (UDESC), Lages, SC, Brazil, presenting a chart of excessive salivation for four days. The animal consumed food and water normally, it had no regurgitation and feces and urine were normal. It was maintained on a pasture with red clover (*Trifolium pratense*), and received commercial animal feed around three kg per day, mineral and water *ad libitum*. The intense salivation was observed by the owner 24 hours after the introduction of the animal in the pasture with red clover. The cause remained stable with no other clinical alterations. Normothermia, heart rate (36 beats/min), respiratory rate (16 breathing/min), strong pulse, dehydration degree lower than 5% and regular nutritional status were observed at the physical examination. The animal presented excessive salivation (Figure 1) without lesion in the oral cavity or tongue at inspection and no esophageal obstruction at nasogastric tube. There was normal ingestion of water and alfalfa hay when offered, without dysphagia or regurgitation. Use of cholinergic drugs or cholinesterase inhibitors, which could lead salivary stimulation, was not stated. Upon the inspection of the pasture, black patches in concentric circles on the leaves of red clover compatible with infection by *Rhizoctonia leguminicola* fungus were found (Figure 2). The suspicion was slaframine toxicosis and the removal of the animal from the pasture with clover

was indicated as treatment. The clinical sign of intense salivation (sialorrhoea) stopped by 24h after the feed had been withdrawn confirming the therapeutic diagnosis of slaframine toxicosis.



Figure 1. Seven year-old gelding crossbreed horse, used for traction, presenting a chart of excessive salivation (sialorrhoea) due to slaframine toxicosis in red clover (*Trifolium pratense*) contaminated by *Rhizoctonia leguminicola* fungus.



Figure 2. Leaves of Red clover (*Trifolium pratense*) with black patches indicating the presence of the fungus *Rhizoctonia leguminicola*.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The slobbers syndrome was first described in cattle in the 30s, although the condition probably has already been observed previously (2,5). Diagnosis of poisoning requires complete physical examination, the main finding is excessive salivation, associated with exposure to forage presenting phytopathological changes consistent with infection by fungus.

Resources for the isolation and identification of *Rhizoctonia leguminicola* or slaframine detection are limited and unnecessary in most cases, although chromatographic methods for the detection of toxin in hay, plasma and milk had been reported (1,3,7).

Wijnber et al. (9) described the slobbers syndrome outbreak in horses ingesting the Netherlands Red clover where salivation was the only clinical signs presented. Borges et al. (3) reported an outbreak of slaframine in Mangalarga Paulista breed horses in Brazil after the alfalfa hay was contaminated, but the majority of cases involve eating clover. Physical descriptions of changes in leaf clover observed in the present report (circular concentric blackened spots) are similar to those described in the literature for the fungus *Rhizoctonia leguminicola* observed by other authors (2,3,7).

According to Schmitz (10), the clinical signs of acute drooling accompanied by the identification of the fungus *Rhizoctonia leguminicola* are sufficient to establish the diagnosis. Even if the toxin present in clover contaminated with the black spots have not been analyzed, the typical clinical signs and resolution after removal of clover horses and the absence of lesions in the oral cavity justifying a diagnosis of poisoning slaframine (9). Generally, it does not require any treatment, because the animals can recover spontaneously when contaminated food source is removed, yet the clinical signs may persist for 1-2 days (7). In severe cases, the use of atropine was used with questionable effectiveness. In horses and ruminants gastrointestinal side effects may occur with atropine (1,4).

As prevention, owners should be aware of the typical appearance of forage or hay infected and instructed not to allow the animal to have access to the suspected food or only allow access to a limited number of animals in order to verify some clinical demonstration (1).

This case report underlines the inclusion of slaframine intoxication in the differential diagnosis of cases of excessive salivation in horses.

REFERENCES

1. Smith GW. Slaframine. In: Gupta RC. Veterinary Toxicology. 2nd ed. Boston: Academic Press; 2012. p.1227-30.
2. Hagler WM, Behlow RF. Salivary syndrome in horses: identification of slaframine in red clover hay. Appl Environ Microbiol. 1981;42(6):1067-73.
3. Borges AS, Oliveira-Filho JP, Simon JJ, Palumbo MIP, Imerman PM. Slaframine toxicosis in Brazilian horses causing excessive salivation. Equine Vet Educ. 2012;24(6):279-83.
4. Poppenga RH. Slaframine intoxication. Equine Vet Educ. 2012;24(6):284-5.
5. Croom WJ, Hagler WM, Froetschel MA, Johnson AD. The involvement of slaframine and swainsonine in slobbers syndrome: a review. J Anim Sci. 1995;73(5):1499-508.
6. Perusia OR, Rodriguez RA. Micotoxicosis. Rev Investig Vet Peru. 2001;12(2):87-116.
7. Riet-Correa F, Rivero R, Odriozola E, Adrien ML, Medeiros RMT, Schild AL. Mycotoxicoses of ruminants and horses. J Vet Diagn Invest. 2013;25(6):692-708.
8. Fink-Gremmels J, Diaz DE. Mycotoxins in forages. In: Diaz DE. The Mycotoxin Blue Book. Nottingham: University Press; 2005. p.249-68.

9. Wijnberg ID, Van Der Ven PJ, Gehrman JFG. Outbreak of salivary syndrome on several horse farms in the Netherlands. *Vet Rec.* 2009;164(19):595-7.
10. Schmitz DG. Toxicologic problems. In: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC. *Equine internal medicine*. 2nd ed. St. Louis: Saunders; 2004. p.1441-512.

Recebido em: 26/04/2014

Aceito em: 01/07/2015

MASTITE NECROSANTE EM CADELA: RELATO DE CASO

Sidnei Nunes de Oliveira¹
Fabíola Soares Zahn²
Felipe Morales Dalanezi¹
Endrigo Adonis Braga de Araujo¹
Luis Fernando Mercês Chaves Silva¹
Nereu Carlos Prestes²

RESUMO

A infecção da glândula mamária pode ser causada por vários patógenos, sendo os principais causadores *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Relata-se caso incomum de mastite necrosante em cadela no pós-parto causada pela associação de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. hemolíticos, com ênfase ao diagnóstico e evolução após o tratamento. No momento do primeiro atendimento, o animal apresentava estado geral ruim, caquexia, desidratação, apatia, aumento de temperatura corpórea. Diversas mamas de ambas as cadeias mamárias apresentavam secreção láctea evidente, áreas arroxeadas com aumento de volume e temperatura local. A terapia antimicrobiana empírica com ceftriaxona foi iniciada. Cinco dias após o primeiro atendimento, foram evidenciadas áreas ulceradas com perda de tecido necrótico. *Staphylococcus* e *Streptococcus* β -hemolítico foram isolados. O tratamento tópico com glicerina iodada 10% e pomada a base de digluconato de clorexidina foi adicionado ao uso parenteral de ceftriaxona e esta conduta mostrou-se eficiente neste caso. A apresentação clínica foi revertida e observou-se cicatrização dos tecidos acometidos.

Palavras-chave: canino, glândula mamária, necrose, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

NECROTIZING MASTITIS IN A BITCH: CASE REPORT**ABSTRACT**

Mammary gland infections may be caused by several pathogens, the most common are *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. The aim of the present report is to describe one case of necrotizing mastitis involving those agents in a post-partum bitch, emphasizing both diagnosis and evolution after therapy. At the moment of the first consult, the animal was cachectic, dehydrated, apathetic and presented elevated body temperature. Multiple mammary glands presented marked milk secretion, edema, increased local temperature and some evident areas of blue skin. Empiric antimicrobial therapy with ceftriaxone was initiated. Five days later, necrotic tissue was lost and mammary glands presented extensive ulceration. *Staphylococcus* and β -hemolytic *Streptococcus* were isolated. Topic therapy with 10% glycerinated iodine and chlorhexidine gluconate ointment was added to antimicrobial therapy and this management was proven efficient in this case. Clinical presentation was reversed and a perfect tissue recovery was observed.

Keywords: dog, mammary gland, necrosis, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

¹ Residente em Reprodução e Obstetrícia Veterinária, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ-UNESP/ Botucatu-SP. Contato principal para correspondência.

² Professor(a) Dr(a). do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Reprodução e Obstetrícia Veterinária, FMVZ-UNESP/ Botucatu-SP.

MASTITIS NECROTIZANTE EN PERRA: RELATO DEL CASO

RESUMEN

La infección de la glándula mamaria puede ser causada por diversos patógenos, siendo la causa principal el *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. El objetivo de este trabajo es presentar un caso de mastitis necrotizante en una perra postparto causada por estos agentes, abordando el diagnóstico y el tratamiento. El animal mostró un mal estado general, caquexia, deshidratación, apatía, aumento en la temperatura corporal y ambas cadenas mamarias presentaron secreción de leche evidente, áreas de color púrpura con aumento en el volumen y la temperatura local. La terapia antibiótica empírica se inició con ceftriaxona. Cinco días después de la primera visita, se evidenciaron regiones con úlceras y pérdida del tejido necrótico. *Staphylococcus* y *Streptococcus* β -hemolítico se aislaron. El antibiótico de elección es la ceftriaxona y tratamiento tópico fue realizado con glicerol yodado al 10% y pomada a base de digluconato de clorhexidina, ambos eficientes para el caso reportado. Por lo tanto, el cuadro clínico que el animal presentaba fue resuelto y se evidenció una cicatrización perfecta de los tejidos.

Palabras clave: canino, glándula mamaria, necrosis, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

INTRODUÇÃO

A glândula mamária é uma glândula cutânea, assim como as sebáceas e sudoríparas (1) e se origina do ectoderma embrionário. Existem diversas patologias que acometem a glândula mamária, dentre as quais a mastite, caracterizada por inflamação mamária, na qual seus principais eventos são: alterações físicas, químicas e bacteriológicas no leite e alterações no tecido da glândula mamária (2-4).

Em cadelas a mastite pode ocorrer após episódios de pseudociese ou parto (1,4-7), geralmente relacionada à perda da ninhada, produção láctea excessiva em relação ao tamanho da ninhada ou falta de higiene. A infecção da glândula mamária pode levar a uma disseminação sistêmica do patógeno e também acometer outros órgãos como, por exemplo, o útero (7).

Vários patógenos podem causar infecção intramamária e os mais comuns são *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Escherichia coli* (4,8). A mastite necrosante é uma afecção frequente em pequenos ruminantes (2,8,9) e incomum em éguas, cadelas e gatas (1) sendo o *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *Clostridium* sp. os principais causadores deste tipo de mastite (6).

A mastite se apresenta sintomatologicamente nas formas, aguda e crônica. Na fase aguda, a glândula mamária apresenta secreção anormal, sensibilidade dolorosa à palpação, rubor, aumento de temperatura regional, depressão e quadro febril (6). Com a progressão do caso, podem ser encontrados nódulos mamários, enrijecimento difuso do parênquima mamário, pontos de necrose e fistulas que drenam pus (6,7), além de sinais sistêmicos.

Entretanto, são raros os relatos descrevendo mastite necrosante em cadelas. Desta forma, relata-se caso de mastite necrosante em cadela, abordando achados clínicos, diagnóstico e tratamento.

RELATO DO CASO

Relata-se caso de mastite necrosante em cadela sem raça definida, não castrada, adulta, pesando 16 Kg, apresentando aumento significativo das glândulas mamárias, atendida no

Ambulatório de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ-UNESP/ Botucatu, SP.

À anamnese, o proprietário referiu que o animal foi encontrado em terreno baldio dois dias antes do atendimento. O animal não estava se alimentando e bebia água várias vezes ao dia. Apresentava aumento das mamas e frequentes lambeduras nesta região, com presença de secreção láctea. Não foi achado nenhum filhote neste mesmo local onde a fêmea foi encontrada, mesmo após várias buscas.

Ao exame clínico, o animal apresentava mucosas hipocoradas, desidratação (8%), caquexia, apatia, alteração da temperatura corpórea (39,6°C), vasos episclerais ingurgitados, frequência cardíaca 200 bpm e frequência respiratória 52 mrpm, com evidente aumento de volume e temperatura em ambas as cadeias mamárias, áreas de pele enegrecidas e presença de secreção mamária de coloração amarelada (Figura 1). À palpação abdominal verificou-se aumento de volume de cornos uterinos, sugestivo de puerpério.

A colheita de sangue foi efetuada para a realização de hemograma e exames bioquímicos. Os achados hematológicos revelaram anemia normocítica e normocrômica, e leucograma caracterizado por leucopenia, linfopenia e monocitose. O exame bioquímico revelou hipoproteinemia e hipoalbuminemia. Para a realização do exame microbiológico, a cadela foi devidamente contida sobre uma mesa em decúbito lateral esquerdo. O local de colheita foi higienizado com compressa de gaze estéril embebida em digluconato de clorexidina 2%, enxaguado com solução fisiológica estéril e secado com compressa de gaze estéril. A secreção da glândula mamária foi colhida com *swab* estéril, este foi colocado em um frasco contendo meio de transporte Stuart e, em seguida, enviado ao laboratório para cultura e antibiograma.

O diagnóstico de mastite foi realizado com base na apresentação clínica do animal. De imediato, foi submetido à fluidoterapia (Ringer-Lactato® 10mL/Kg/hora) visando a hidratação e iniciou-se o tratamento parenteral com administração de ceftriaxona (20mg/Kg) BID durante 10 dias por via intramuscular, meloxicam (0,1mg/Kg) SID durante três dias por via oral, massagem local com pomada iodetada e uso do colar elisabetano para evitar lambedura. Para restabelecer o apetite, indicou-se que a fêmea fosse alimentada com ração úmida.

A amostra contendo a secreção foi cultivada em meio seletivo de Ágar MacConkey e meio de ágar sangue ovino (5%), incubados em condições de aerobiose a 37°C durante 24 a 48 horas (10). Os micro-organismos isolados foram identificados com base nos achados macro e microscópicos da colônia, bem como características morfotintoriais e perfil bioquímico dos isolados (11). O exame citológico do conteúdo revelou presença de cocos Gram positivos, agrupados ou dispostos em cadeias (12). Após 24 horas de incubação, foram isoladas colônias opacas, lisas, douradas com mais de 4 mm de diâmetro, com zona larga de hemólise parcial ou incompleta ao redor, associado a colônias pequenas e translúcidas, mucoides, apresentando hemólise completa ao seu redor (11,12).

Os agentes isolados após 48 horas foram caracterizados como *Staphylococcus* e *Streptococcus* β -hemolíticos. Logo após, foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana *in vitro*, pelo método de difusão em discos *Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI* (13). Ambos os isolados apresentaram-se sensíveis à ceftriaxona já utilizada no tratamento instituído empiricamente.

Após cinco dias, o animal retornou ao atendimento, com ulceração das mamas, perda de toda a porção de pele necrosada e desprendimento do parênquima das glândulas afetadas, porém com melhora significativa do estado geral (Figura 2). Assim, acrescentou-se ao tratamento o curativo tópico com glicerina iodada a 10% e pomada a base de digluconato de clorexidina (em quantidade suficiente para cobrir toda a área afetada) até a completa cicatrização. O animal retornou ao ambulatório 35 dias depois, apresentando cicatrização da área afetada (Figura 3) e bom estado geral.

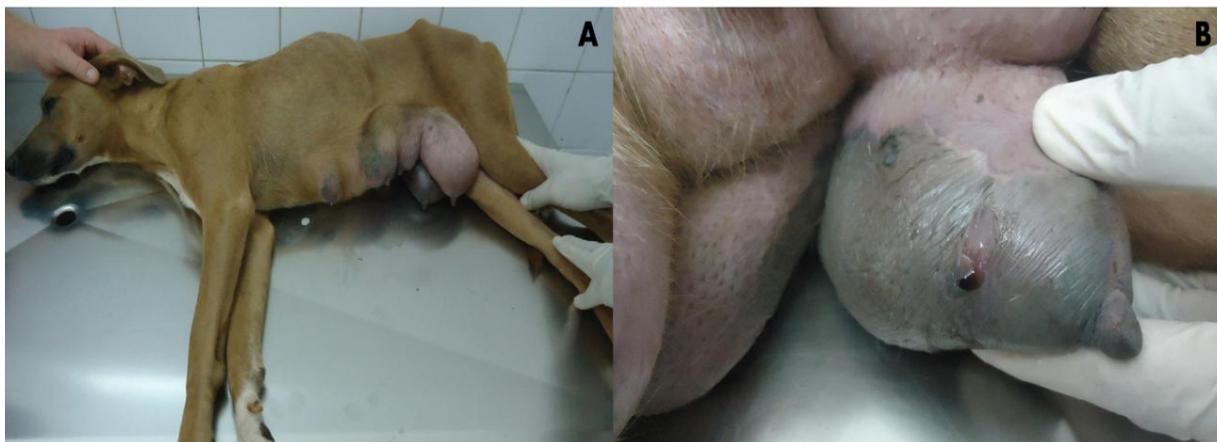


Figura 1. Estado geral da cadela, apresentando mastite necrosante severa com áreas de pele enegrecidas em glândulas mamárias, primeiro dia do atendimento (A) e mamas com presença de pele enegrecida com áreas de necrose evidente (B).



Figura 2. Progressão do caso em cadela com mastite necrosante, apresentando necrose tecidual evidente, cinco dias após o atendimento inicial (A e B).



Figura 3. Cadela com plena recuperação e cicatrização tecidual das glândulas mamárias, após o término do tratamento da mastite necrosante.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

São raros os relatos de mastite necrosante em cadelas com detalhes da etiologia e do tratamento, sendo mais comuns os casos descritos em pequenos ruminantes (10). O caso de mastite relatado ocorreu após o parto e com ausência dos fetos concordando, portanto, com os achados de Ververidis et al. (7), os quais relataram maior incidência de casos no pós-parto de cadelas com morte da ninhada.

Os sinais clínicos apresentados pelo animal neste relato estão de acordo com os achados de Jutkowitz (9), Ribeiro et al. (6) e Ververidis et al. (7) em cadela e de Courtney (14) em gata. Possivelmente houve evolução da enfermidade, progredindo da fase aguda para alterações sistêmicas, culminando com abscessos característicos da mastite necrótica. Evolução semelhante ao presente caso clínico foi descrita por Ververidis et al. (7).

O diagnóstico da enfermidade baseou-se na anamnese, exame clínico, cultivo e identificação microbiológica, aliado ao teste de sensibilidade microbiana *in vitro* (antibiograma). O tratamento com o respaldo do antibiograma evita o uso indevido de antimicrobianos, e minimiza a pressão seletiva para bactérias multirresistentes, que podem levar a baixa taxa de cura e complicações que comprometam o estado geral do animal.

Os agentes etiológicos isolados foram *Staphylococcus* e *Streptococcus* β -hemolítico, ambas bactérias da microbiota de pele e mucosas, oportunistas comumente descritos como causadores de mastite em bovinos e pequenos ruminantes (10,15), felinos (4,14) e caninos (4,9,16).

No presente relato, é possível que a ascensão dos micro-organismos para a glândula mamária tenha ocorrido devido à retenção de secreção láctea pela ausência dos neonatos e falta de higiene, já que este animal foi encontrado em terreno baldio. Situação similar também foi relatada por Jutkowitz (9), que descreveu como vias de penetração dessas bactérias os canais lactíferos devido a traumas, falta de hábitos higiênicos nas mamas ou retenção de leite, podendo ser disseminado por via hematogênica.

Quanto ao tratamento sistêmico, optou-se por um antibacteriano de amplo espectro pertencente ao grupo das cefalosporinas, sugerido na literatura para os casos de mastite em cadelas (9,16). O tratamento foi realizado antes do teste de sensibilidade, devido ao grave quadro clínico emergencial apresentado pelo animal, não havendo mudança quanto ao fármaco recomendado após o resultado do antibiograma, pois ambos os micro-organismos identificados apresentaram sensibilidade ao fármaco, resultando em êxito na recuperação do paciente.

O curativo tópico mostrou-se eficiente e adequado, observando-se plena recuperação e cicatrização tecidual. O diagnóstico precoce da mastite, assim como o exame hematológico e o isolamento do agente causal, com o estabelecimento de antibioticoterapia adequada com base em testes *in vitro* de sensibilidade aos antimicrobianos foram fundamentais para a reversão do quadro clínico e restabelecimento da saúde do animal.

REFERÊNCIAS

1. Feitosa FLF. Semiologia da glândula mamária de éguas, cadelas e gatas. In: Semiologia veterinária. 3a ed. São Paulo: Roca; 2014. p.298-300.
2. Heidrich HD, Gruner J, Vaske TR. Manual de patologia bovina. São Paulo: Varela; 1980. p.168-70.
3. Blood DC, Radostits OM, Henderson JA. Veterinary medicine. 7a ed. London: Baillière Tindall; 1994.

4. Landim-Alvarenga FC, Prestes NC. Lactação e patologias da glândula mamária. In: Prestes NC, Landim-Alvarenga FC. *Obstetrícia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.97-102.
5. Borowsky LM, Driemeier D, Rozza DB, Cardoso MRI. Mastite com septicemia em caninos causadas por *Staphylococcus intermedius*. *Acta Sci Vet*. 2003;31:111-3.
6. Ribeiro MG, Lopes MD, Prestes NC, Siqueira AK. Mastite infecciosa canina. Relato de quatro casos e revisão de literatura. *Clin Vet*. 2005;57:64-72.
7. Ververidis HN, Mavrogianni VS, Fragkou IA, Orfanou DC, Gougoulis DA, Tzivara A, et al. Experimental staphylococcal mastitis in bitches: Clinical, bacteriological, cytological, haematological and pathological features. *Vet Microbiol*. 2007;124:95-106.
8. Drescher G, Mattiello SP, Peixoto RM, Vargas AC, Maciel MN, Costa MM. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. *Cienc Anim Bras*. 2010;11:188-93.
9. Jutkowitz LA. Reproductive emergencies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2005;35:397-420.
10. Ribeiro MG, Lara GHB, Bicudo SD, Souza AVG, Salerno T, Siqueira AK, et al. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2007;59:810-2.
11. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby-Year Book Europe; 1994.
12. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed; 2005.
13. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth Information Supplement. Wayne: CLSI; 2010.
14. Courtney RW. Feline gangrenous mastitis. *Can Vet J*. 2013;54:292-4.
15. Refai M. Mastitis, aetiology, diagnosis and control. *J Egypt Vet Med Ass*. 1988;48:521-45.
16. Graham EM, Taylor DJ. Bacterial reproductive pathogens of cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2012;42:561-82.

Recebido em: 27/05/2014

Aceito em: 08/07/2015

DEMODICOSE GENERALIZADA ADULTA E JUVENIL: RELATO DE DOIS CASOS

Suyane Nayara Garcia Socoloski¹
Mayara da Cruz Burema¹
Bianca Garay Monteiro¹
Ana Maria Dalla Vecchia¹
Carolina Zorzo¹
Elaine Cristina Pereira de Almeida¹
Alinne Pinhal Braga¹
Thaís Badini Vieira²

RESUMO

A demodicose é uma enfermidade causada pela proliferação exacerbada do ácaro *Demodex canis*. A doença pode ser classificada como adulta ou juvenil e localizada ou generalizada, sendo identificada como uma das dermatopatias mais frequentes na rotina da clínica médica de pequenos animais. Objetivou-se com este estudo, relatar dois casos de animais com demodicose generalizada, um juvenil e o outro adulto.

Palavras- chave: *Demodex canis*, tratamento, cães.

WIDESPREAD DEMODICOSIS ADULT AND JUVENILE: TWO CASES REPORT

ABSTRACT

The demodicosis is a disease caused by the excessive proliferation of the mite *Demodex canis*. The disease can be classified as adult or juvenile and localized or generalized, being identified as one of the most common skin diseases in the routine of medical clinic for small animals. The objective of this study was to report two cases of animals with generalized demodicosis, a juvenile and the other adult.

Keywords: *Demodex canis*, treatment, dogs.

DEMODICICOSIS GENERALIZADA ADULTA Y JUVENIL: DOS CASOS DE INFORME

RESUMEN

La demodicosis es una enfermedad causada por la proliferación excesiva de ácaros *Demodex canis*. La enfermedad puede clasificarse como adulto o juvenil localizada o generalizada, siendo identificada como una de las enfermedades de la piel más comunes en la clínica médica de rutina de los animales pequeños. El objetivo de este trabajo presentar dos casos de animales con demodicosis generalizada, un juvenil y el otro adulto.

Palabras clave: *Demodex canis*, tratamiento, perros.

¹ Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Câmpus Universitário de Sinop, Sinop, MT - Contato principal para correspondência.

² Professora Adjunto II da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Câmpus Universitário de Sinop, Sinop, MT

INTRODUÇÃO

O *Demodex canis* é um ácaro comensal que habita os folículos pilosos e menos comumente as glândulas sudoríparas de caninos sem comprometer a integridade do tecido superficial dos animais. A proliferação exacerbada do ácaro é a causa da demodicose e que abre porta de entrada para infecções bacterianas secundárias, tornando-a uma das afecções dermatológicas mais comuns da clínica médica de pequenos animais (1,2).

A classificação desta doença pode ser feita de acordo com a distribuição da lesão na pele (localizada ou generalizada) e a idade em que aparecem os primeiros sinais clínicos no animal (juvenil e adulto). De acordo com Plant et al. (3), cães com inúmeras lesões, duas ou mais patas envolvidas, ou com grandes regiões da pele afetada, são classificados como tendo demodicose juvenil generalizada (DGJ; desenvolvida antes dos 18 meses de idade) ou demodicose adulta generalizada (normalmente ocorrida em cães com mais de 4 anos).

O diagnóstico da enfermidade, localizada ou generalizada, é realizado facilmente por raspado profundo de pele. A demodicose localizada frequentemente costuma regredir não havendo necessidade de tratamento na maioria dos casos (1). Por outro lado, a demodicose generalizada necessita de maior tempo e cuidado por parte do proprietário e do médico veterinário, visto que o tratamento pode ser demorado e se torna frustrante, quando o animal não reage bem ao protocolo proposto. A Ivermectina e Moxidectina da classe das lactonas macrolíticas são utilizadas constantemente nos protocolos de tratamento desta afecção como alternativas ao uso do Amitraz (1,4,5).

Objetivou-se com este trabalho relatar dois casos de animais com demodicose generalizada, uma adulta e outra infantil.

RELATO DOS CASOS

Caso 1

No dia 23 de abril de 2014, no Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá, foi atendida uma cadela da raça Pit Bull Terrier, não castrada, com sete anos de idade, pesando 25,4 kg, que apresentava cio há dez dias. Neste animal foram evidenciadas lesões alopecias circunscritas, úmidas e crostosas no dorso, membros, pescoço e face. No perfil hematológico foi constatada anemia e trombocitopenia leve, com presença de erliquiose. O animal foi tratado com Doxiciclina, via oral, 10mg/Kg/duas vezes ao dia/por 28 dias e Ferro Food[®] por via oral/um comprimido/uma vez ao dia, também por 28 dias. No raspado profundo de pele foi identificado *Demodex canis*, confirmando o diagnóstico de sarna demodécica.

No dia 08 de maio de 2014 a paciente retornou ao hospital apresentando piora nas lesões de pele e piodermite, além de prurido intenso, o que causou a ulceração da face. Estabeleceu-se o protocolo de tratamento da pele com Ivermectina, via oral, 0,5 mg/kg /uma vez ao dia/40 dias, Cefalexina, via oral, 30mg/kg/duas vezes ao dia/ por 7 dias, e banhos a cada 4 dias com xampu de Clorexidine 4% durante 6 semanas.

O animal retornou três dias depois apresentando melhora nas lesões de pele, mas estas ainda estavam úmidas e alopecias. Como não houve reações adversas à medicação, recomendou-se continuar os banhos e a Ivermectina. Após 30 dias (11 de julho de 2014) foi realizado um novo raspado de pele o qual apresentou ainda resultado positivo para o ácaro.

O exame parasitológico foi repetido após 21 dias com diagnóstico negativo para *Demodex canis*. Com esse resultado optou-se por continuar o tratamento e repetir o exame por mais duas vezes com intervalos de 15 dias. Como ambos foram negativos, interrompeu-se o tratamento uma vez que o animal foi considerado curado para a enfermidade.

Caso 2

Foi atendida no dia 09 de maio de 2014 no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso – Campus Sinop, uma cadela, não castrada, raça Pug, de cinco meses de idade, que há 20 dias apresentara lesões pruriginosas, que evoluíam com exsudato amarelado, hiperpigmentação e espessamento da pele, localizadas em face, abaixo do pescoço (Figura 1a e 1b) e no membro torácico direito. Devido à intensidade e gravidade das lesões foi possível realizar o diagnóstico de *Demodex canis* por meio do *imprint* da pele.

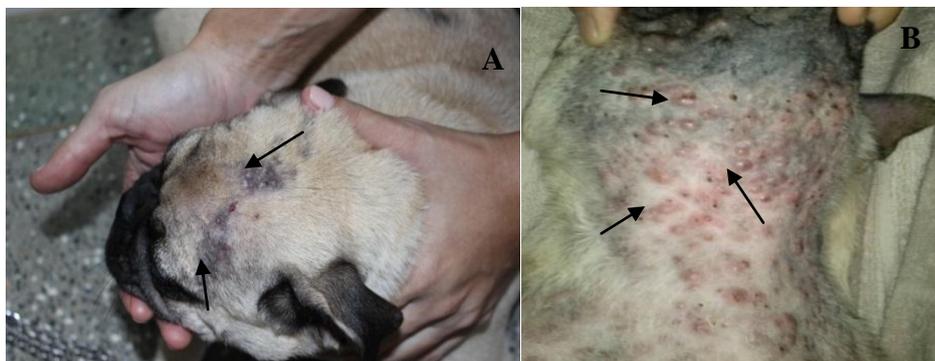


Figura 1. A) Lesões pruriginosas, hiperpigmentadas e espessadas, localizadas em face, (B) Lesões eritematosas e pustulares causadas por infecção secundária na região do pescoço.

O tratamento foi iniciado com Moxidectina 1% 0,5mg/kg a cada 72 horas, via oral e banho com peróxido de benzoíla 2,5% uma vez por semana. Após 18 dias de tratamento houve piora clínica com aparecimento de lesões pustulares espalhadas pelo corpo, atingindo também a cabeça. Optou-se, então, pela utilização de Cefalexina, por via oral, 30mg/kg/duas vezes ao dia, por 20 dias. Após 10 dias da interrupção da Cefalexina, observou-se piora clínica com aumento significativo das lesões pustulares que se espalharam pelo corpo do animal. Optou-se por reiniciar a antibioticoterapia em 27 de junho com Enrofloxacina na dosagem 5mg/kg/via oral/uma vez ao dia. Contudo após três dias de tratamento houve agravamento do quadro clínico. A antibioticoterapia foi realizada por sete dias e como não houve melhora significativa das lesões pustulares, em seis de julho recomendou-se a substituição completa do protocolo de tratamento da demodicose, uma vez que em dois raspados de pele realizados foram encontrados *Demodex canis*.

Em seis de julho, iniciou-se protocolo de banho com Amitraz 12,5%, na diluição de um mL para 250 mL de água, aplicado juntamente com a xampu de peróxido de benzoíla 2,5%, por 30 minutos, duas vezes por semana, Cefalexina 30 mg/kg/via oral/duas vezes ao dia, por 30 dias e coleira antiparasitária contendo Amitraz. Não obstante, foi realizada coleta do exsudato com swab estéril para cultivo bacteriano e teste de sensibilidade frente aos antibióticos: Amoxicilina/Ácido Clavulânico 30µg, Gentamicina 10µg, Enrofloxacina 5µg, Doxiciclina 30µg, Ciprofloxacina 5µg, Cefalexina 30 µg, Neomicina 30µg, Sulfametoxazol Trimetropim 25µg, Azitromicina 15µg e Tetraciclina 30µg. Após 15 dias de tratamento com o segundo protocolo, o animal apresentou melhora significativa com preenchimento de pêlos em alguns locais das lesões, não sendo observadas lesões pustulares.

Foram realizados dois exames de sangue, um no início do tratamento e outro um mês após, não havendo alterações no hemograma e Alanina Aminotransferase (ALT), estando ambos os exames dentro dos padrões de normalidade para a idade e espécie do animal.

Durante o tratamento o animal não apresentou reações adversas aos protocolos utilizados, porém a Moxidectina não foi eficaz no tratamento da demodicose.

DISCUSSÃO

Antes de iniciar o tratamento para demodicose ambos os animais apresentavam mais de cinco áreas de lesões alopecicas, eritematosas, crostosas distribuídas pelo corpo, com visível pododermite por infecção secundária em algumas regiões, assim como relatado por outros pesquisadores (1,5).

No cultivo bacteriano do segundo caso analisado, foram isoladas duas cepas de *Staphylococcus* spp e três de *Streptococcus* spp, reforçando as informações de Mueller et al. (2), os quais afirmaram que é comum a presença de bactérias Gram positivas em casos de demodicose com infecção bacteriana secundária, sendo mais comum a presença de *Staphylococcus pseudintermedius*. No teste de sensibilidade antimicrobiana a Doxiciclina 30µg foi a única droga a qual ambos, *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp, foram sensíveis. Silva et al. (6) relatam um percentual de 95,5 de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. à Doxiciclina e de 98,1% à Cefalexina, o que justifica o uso deste medicamento como sendo de primeira escolha no caso de pododermítes com infecção bacteriana secundária.

O tempo de tratamento para ser obtido o primeiro resultado parasitológico negativo do animal com demodicose generalizada adulta foi de 56 dias, tempo inferior aos 90±8 dias relatados por Delayte et al. (4), utilizando a Ivermectina 0,5 mg/kg/via oral associada a banhos com peróxido de benzoíla. O animal não apresentou reações adversas ao tratamento com Ivermectina, porém Delayte et al. (4), relatam reações adversas, como: midríase, êmese, sonolência, sialorréia e apatia. A Ivermectina é um medicamento com boa margem de segurança, porém pode ocorrer intoxicação quando a barreira hematoencefálica é ultrapassada. Esta sensibilidade às Avermectinas, de modo geral, é causada pela mutação do gene MDR1 (mais comum em Collies) (7).

A demodicose generalizada juvenil (DGJ), que normalmente tem início dos primeiros sintomas entre os três primeiros meses de vida até os 18 meses de idade, está mais relacionada à transmissão autossômica recessiva (1). Apesar de não ser bem esclarecido, os estudos de Scoot et al. (1) e Ferrer et al. (8), apontam para uma responsabilidade dos linfócitos T citotóxicos que são ativados por irregularidades na função de linfócitos T *helper*. Uma diminuição na produção de interleucina 2 (IL-2) e do número de receptores para IL-2 nos linfócitos circulantes indica um defeito no processamento e apresentação dos antígenos de *Demodex canis*, o que conduz a uma resposta inadequada dos linfócitos T *helper* tipo 1. Leitão e Leitão (9), relatam que a transmissão do ácaro ocorre por contato da mãe com os filhotes e entre os filhotes da ninhada nas primeiras 48 a 72 horas de vida. Não há relatos de transmissão transplacentária, uma vez que, em cães nascidos por cesariana e separados das mães infectadas e em fetos abortados, o ácaro não foi encontrado. Os mesmos autores esclarecem também, que esta doença não é contagiosa entre animais saudáveis após o período neonatal, pois o convívio em confinamento de animais com demodicose generalizada e animais sadios não resultou em doença ativa nos animais saudáveis. A cadela com DGJ convivia com mais três animais adultos nos quais não foram evidenciadas quaisquer lesões sugestivas da enfermidade, confirmando o caráter não contagioso da demodicose após o período neonatal.

Quanto ao uso da moxidectina 5mg/kg/via oral, esse protocolo não foi eficaz no tratamento da pug com demodicose juvenil generalizada (animal relatado no caso 2). Contudo, Delayte et al. (4) relataram uma eficácia de 87% com o mesmo protocolo e Fukaori et al. (5) conseguiram a cura parasitológica de dois cães tratados com 0,5 mg/kg de moxidectina, por via oral, a cada 4 dias. Wagner e Wendlberger (10), também conseguiram 100% de eficácia com o uso da moxidectina, porém com a dose de 0,4 mg/kg via oral, diariamente. Delayte et al. (4), relatam que reações adversas ao tratamento com moxidectina tais como, êmese e sonolência podem ocorrer, porém o animal com DGJ submetido ao protocolo com moxidectina não apresentou reações adversas.

Delayte et al. (4) relataram que os animais apresentaram uma boa resposta às lactonas macrolíticas, porém ainda há animais que não reagem positivamente ao protocolo de tratamento proposto com essas drogas. O animal com DGJ não respondeu ao tratamento com esse fármaco, havendo a necessidade de substituição do protocolo, optando-se pelo tratamento com amitraz.

CONCLUSÃO

A demodicose generalizada é uma enfermidade que necessita de tratamento prolongado e quando associada à infecção bacteriana secundária causa mais desconforto aos animais acometidos. Os animais nem sempre respondem positivamente aos fármacos, havendo, assim, a necessidade de completa mudança no protocolo de tratamento. A fim de reduzir a ocorrência da doença, principalmente em sua forma juvenil, recomenda-se a castração dos animais positivos para demodicose canina generalizada, por se tratar de uma doença hereditária.

REFERÊNCIAS

1. Scoot DW, Miller WH, Griffin CE. Parasitic skin diseases. *Canine demodicosis*. In: Muller, Kirk's. Small animal dermatology. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001. p.457-74.
2. Mueller RS, Bensignor E, Ferrer L, Holm B, Lemarie S, Paradis M, et al. Treatment of demodicosis in dogs: 2011 clinical practice. *Vet Dermatol*. 2012;23(6):86-e21.
3. Plant JD, Lund EM, Yang M. A case-control study of the risk factors for canine juvenile-onset generalized demodicosis in the USA. *Vet Dermatol*. 2010;22(1):95-9.
4. Delayte EH, Otsuka M, Larsson CE, Castro RCC. Eficácia das lactonas macrolíticas sistêmicas (ivermectina e moxidectina) na terapia da demodicose canina generalizada. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2006;58(1):31-8.
5. Fukaori FLP, Lima ER, Rego MAS, Dias MBMC, Ferreira MAQB, Silva VCL, et al. Eficácia do uso de moxidectina por via oral no tratamento de demodicose em cães: breve relato de dois casos. *Med Vet*. 2013;7(1):31-4.
6. Silva AP, Schimidt C, Vargas AC, Maboni G, Rampelotto C, Schwab ML, et al. Susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de cães com pioderma superficial. *Pesqui Vet Bras*. 2014;34(4):355-61.
7. Souto FJ. Demodicose - Revisão de Literatura [Monografia]. Joinville: Universidade Castelo Branco; 2011.
8. Ferrer L, Ravera I, Silbermayr K. Immunology and pathogenesis of canine demodicosis. *Vet Dermatol*. 2014;25(5):427-e65.
9. Leitão JPA, Leitão JPA. Demodicose canina. *Rev Port Cienc Vet*. 2008;103(567-568):135-49.

10. Wagner R, Wendlberger U. Field efficacy of moxidectin in dogs and rabbits naturally infested with *Sarcoptes* spp., *Demodex* spp. and *Psoroptes* spp. Mites. Vet Parasitol. 2000;93(2):149-58.

Recebido em: 19/03/2015

Aceito em: 21/08/2015

PREVALÊNCIA SOROLÓGICA DE *Leptospira* spp. EM BOVINOS LEITEIROS NA MICRORREGIÃO DE FRANCISCO BELTRÃO

Mateus Peiter¹
José Francisco Xavier da Rocha²
Felipe Lamberti Pivoto¹
Adelina Rodrigues Aires³
Ricardo Xavier Da Rocha³
José Francisco Manta Bragança³
Abílio Galvão Trindade Ferreira⁴
Marta Lizandra Do Rêgo Leal⁵

RESUMO

Buscando suprir a carência de informações sobre a prevalência dos sorovares de *Leptospira* spp. na microrregião de Francisco Beltrão, objetivou-se nesse trabalho mostrar a soro prevalência da leptospirose. Para tanto, foram analisadas 312 amostras de soro de vacas da raça Holandesa localizadas na microrregião de Francisco Beltrão no estado do Paraná, Brasil. O resultado foi uma frequência de 41,35% de vacas reagentes para pelo menos um dos sorovares. Do total de amostras reagentes para os variados sorovares, a frequência foi a seguinte: Icterohaemorrhagiae 4,65%, Pomona 3,10%, Hardjo 81,39%, Wolffi 29,46%, Grippotyphosa 6,98%, Butembo 5,43%. Esses dados revelam que vacas de leite da microrregião de Francisco Beltrão apresentam frequência elevada de vários sorovares de *Leptospira* spp. mostrando a importância do conhecimento sorológico desta enfermidade.

Palavras-chave: bovinos, Leptospirose, Hardjo, doença.

SURVEY OF SEROPREVALENCE OF *Leptospiras* pp. IN HOLSTEIN COWS IN THE MICROREGION OF FRANCISCO BELTRÃO

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the prevalence of serovars of *Leptospira* spp. in the microregion of Francisco Beltrão, providing new information and demonstrating the economical importance of the Leptospirosis. Sera samples (n = 312) collected in bovines Holstein Friesian breed reared at the microregion of Francisco Beltrão, state of Paraná (Brazil), were used in this study. A frequency of 41.35% of reagent animals for at least one serovar was detected. The overall frequency for all serovars was the follows: Icterohaemorrhagiae 4.65%, Pomona 3.10%, Hardjo 81.39%, Wolffi 29.46%, Grippotyphosa 6.98%, Butembo 5.43%. These data revealed that cow's milk from the microregion of Francisco Beltrão present a high number of serovars of *Leptospira* spp. showing the importance of the serological knowledge of this disease.

Keywords: bovines, Leptospirosis, Hardjo, disease.

¹ Aluno do Curso de Medicina Veterinária - Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria.

² Professor de Curso de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste de Santa Catarina - Campus São Miguel do Oeste - SC. Contato principal para correspondência.

³ Professor de Curso de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste de Santa Catarina - Campus Xanxere - SC

⁴ Nutre Saúde e Produção Animal.

⁵ Professora Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Clínica de Grandes Animais. Universidade Federal de Santa Maria - RS.

PREVALENCIA SEROLÓGICA DE *Leptospira* spp. EN BOVINOS LECHEROS EN LA MICRORREGIÓN DE FRANCISCO BELTRÃO

RESUMEN

Buscando suplir la carencia de informaciones sobre la prevalencia de los serotipos de *Leptospira* spp. en la microrregión de Francisco Beltrão, el objetivo de este trabajo fue mostrar la importancia económica de la leptospirosis. Para esto, fueron analizadas 312 muestras de suero de vacas de la raza Holandesa localizadas en la microrregión de Francisco Beltrão, en el estado de Paraná, Brasil. El resultado fue una frecuencia de 41,35% de vacas positivas para por lo menos en uno de los serotipos. Del total de muestras reactivas para los variados serotipos, la frecuencia fue la siguiente: Icterohaemorrhagiae 4,65%, Pomona 3,10%, Hardjo 81,39%, Wolffi 29,46%, Grippytyphosa 6,98%, y Butembo 5,43%. Estos datos revelan que vacas de leche de la microrregión de Francisco Beltrão, presentan frecuencia elevada de varios serotipos de *Leptospira* spp., mostrando la importancia del conocimiento serológico de esta enfermedad.

Palabras clave: bovinos, Leptospirosis, Hardjo, enfermedad.

A atividade de bovinocultura leiteira é um dos principais ramos de produção animal do Brasil com importante participação na economia, com um rebanho de aproximadamente 16 milhões de vacas. Minas Gerais, Goiás e Paraná se destacam como sendo os principais estados produtores de leite. Somente no Paraná são mais de 1,5 milhões de vacas leiteiras, que apresentam uma produção média de 5,8 litros por animal por dia (1).

A atividade, bem como os demais ramos da produção animal, está suscetível a inúmeros problemas, dentre eles os reprodutivos, causadores de enormes prejuízos econômicos para as propriedades. Dentre as doenças reprodutivas encontradas com grande frequência, a leptospirose é uma enfermidade infectocontagiosa zoonótica causada por bactérias do gênero *Leptospira* spp. As perdas econômicas em bovinos atingidos pela leptospirose são relacionadas aos transtornos reprodutivos, pois a doença causa infertilidade, abortamentos, nascimento de bezerros fracos e diminuição temporária da produção leiteira (2), além de altos custos com despesas de assistência veterinária e testes laboratoriais (3).

Entre os bovinos, a disseminação de *Leptospira* spp. ocorre principalmente pelos animais doentes ou portadores assintomáticos que podem eliminar a bactéria pela urina, descargas cérvico-vaginais, fetos abortados e placenta, mantendo, dessa forma, a doença endêmica na propriedade e muitas vezes nas propriedades vizinhas (4). A penetração pode ocorrer pela pele lesada, mucosas orais, nasais, oculares e genitais (3).

De acordo com Adler e Moctezuma (5), são conhecidas treze espécies de *Leptospira* atualmente, compreendendo mais de 260 sorovares. Dentre esses, a prevalência no Brasil é bem variada, sendo encontradas de forma mais comum as sorovares Icterohaemorrhagiae, Australis, Bratislava, Canícola, Pomona, Hardjo, Wolffi, Grippytyphosa, Butembo e Castellonis. No entanto, vários estudos demonstram uma grande prevalência do sorovar *Hardjo* (3,6-8).

O diagnóstico da leptospirose pode ser realizado pela demonstração do agente (métodos diretos) e por métodos indiretos (provas sorológicas), que são os mais indicados para o controle em populações de animais (4). A técnica mais eficaz é a soroaglutinação microscópica (SAM), sendo esta também a técnica considerada como padrão ouro para seu diagnóstico (6,9). Alguns fatores podem afetar a especificidade e a sensibilidade deste teste, como coleção de estirpes empregadas como antígenos, idade e densidade dos cultivos, diluição final dos soros, temperatura e tempo de incubação (3). Para sanar a carência de informações a respeito das várias espécies do gênero *Leptospira* na microrregião de Francisco

Beltrão, o objetivo desse estudo foi o de salientar a importância de diagnosticar a soroprevalência dessas bactérias e de adotar medidas adequadas de manejo, a fim de evitar grandes prejuízos para os produtores leiteiros.

Para isso, foram utilizadas 312 amostras de sangue de vacas da raça Holandesa criadas na microrregião de Francisco Beltrão no estado do Paraná, Brasil, com idade entre dois e quatro anos. Os animais eram oriundos de propriedades com sistema semi-intensivo e as amostras foram coletadas por meio de punção da veia coccígea por sistema Vacutainer® em tubos com vácuo sem anticoagulante. Para o diagnóstico sorológico foi utilizado o teste de soroaglutinação microscópica (SAM) com 10 diferentes sorovares de *Leptospira* spp, sendo eles: Icterohaemorrhagiae, Australis, Bratislava, Canícola, Pomona, Hardjo, Wolffi, Grippotyphosa, Butembo e Castellonis (4). Foram considerados os títulos a partir de 1/100. As coletas foram feitas entre os anos de 2007 e 2011 e as análises de médias foram feitas de acordo com o número de animais positivos e negativos. Os resultados da sorologia foram analisados por medidas de tendência central com auxílio do programa GraphPad® Prism 5.

Das 312 amostras sorológicas testadas, 129 foram positivas para pelo menos um dos sorovares, o que resulta em 41,35% de vacas reagentes para leptospirose. Do total de amostras reagentes para os vários sorovares, a frequência foi a seguinte: Icterohaemorrhagiae 4,65%, Pomona 3,10%, Hardjo 81,39%, Wolffi 29,46%, Grippotyphosa 6,98%, Butembo 5,43%. Esses dados mostram uma prevalência elevada do sorovar Hardjona microrregião de Francisco Beltrão e também concordam com Hashimoto et al. (9) que realizaram um levantamento semelhante no estado do Paraná, porém não trabalhando em microrregiões individuais.

Favero et al. (10) realizaram estudo em 21 estados brasileiros, onde encontraram uma prevalência de 84,1% das propriedades com pelo menos um animal reagente, com valores variando entre 74% e 100%, incluindo rebanhos positivos em todos os estados analisados. Ainda, observaram uma ocorrência de 62,3% de animais reagentes.

Alguns procedimentos de manejo podem aumentar a incidência de leptospirose nas propriedades, como a compra de reprodutores infectados, aluguel de pastagens, piquetes para parição, interação com outras espécies animais (9). Juliano et al. (8) citam a interação de vacas leiteiras com ovinos e suínos como um fator predisponente para a leptospirose, além da contaminação do ambiente dos animais.

De acordo com os dados apresentados, fica evidente que vacas de leite da microrregião de Francisco Beltrão apresentam frequência elevada de diferentes sorovares de *Leptospira* spp. tendo como sorovar mais encontrado, o Hardjo. Por fim, é de fundamental importância realizar o diagnóstico dessa enfermidade, buscando o conhecimento sorológico da região.

REFERÊNCIAS

1. Anualpec. Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio; 2012.
2. Cervantes LPM, Puebla MAC, Rosas DG, Serranía NR, Barranca JIT. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. Rev Cubana Med Trop. 2002;54:24-7.
3. Sarmiento AMC, Azevedo SS, Morais ZM, Souza GO, Oliveira FCS, Gonçalves AP, et al. Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. Pesqui Vet Bras. 2012;32:601-6.
4. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne: Medisci; 1999.

5. Adler B, Moctezuma AP. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2009;140:287-96.
6. Figueiredo AO, Pellegrin AO, Gonçalves VSP, Freitas EB, Monteiro LARC, Oliveira JM, et al. Prevalencia e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. *Pesqui Vet Bras.* 2009;29:375-81.
7. Lage AP, Leite RMH, Thompson JA, Bandeira DA, Herrmann GP, Moreira EC, et al. Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the state of Paraíba, Brazil. *Arq Inst Biol.* 2007;74:185-90.
8. Juliano RS, Chaves NST, Santos CA, Ramos LS, Santos HQ, Meireles LR, et al. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia, GO. *Cienc Rural.* 2000;30:857-62.
9. Hashimoto VY, Dias JA, Spohr KAH, Silva MCP, Andrade MGB, Müller EE, et al. Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. *Pesqui Vet Bras.* 2012;32:99-105.
10. Favero M, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Morais ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. *Arq Inst Biol.* 2001;68:29-35.

Recebido em: 10/09/2014

Aceito em: 25/06/2015

LEVANTAMENTO SOROLÓGICO PARA *Neospora caninum* EM VACAS DA RAÇA HOLANDESA DA MICRORREGIÃO DE FRANCISCO BELTRÃO

José Xavier Rocha¹
Felipe Lamberti Pivoto²
Adelina Rodrigues Aires³
Ricardo Xavier da Rocha³
Abilio Galvão Trindade Ferreira⁴
Marta Lizandra do Rego Leal²

RESUMO

A bovinocultura de leite é uma das principais atividades econômicas do Brasil. O protozoário *Neospora caninum* acarreta grandes perdas econômicas nessa atividade, as quais podem ser reduzidas por métodos de controle. Para sanar a carência de informações a respeito do *N. caninum* na microrregião de Francisco Beltrão, o objetivo desse estudo foi analisar a soroprevalência de *N. caninum* e salientar a importância do diagnóstico e da adoção de medidas adequadas de manejo. Para isso, foram analisadas 367 amostras de soro de vacas da raça holandesa localizadas na microrregião de Francisco Beltrão no estado do Paraná, Brasil, com idade entre dois e quatro anos pela reação de imunofluorescência indireta, apresentando frequência de IgG anti *N. caninum* de 35,1%. Isso revela que vacas de leite da microrregião de Francisco Beltrão apresentam frequência de IgG anti-*N. caninum* elevadas e independente do método a ser realizado, é de suma importância o diagnóstico dessa enfermidade para que medidas de controle sejam implementadas e as perdas minimizadas.

Palavras-chave: bovinos de leite, controle, epidemiologia, protozoário.

SEROLOGICAL SURVEY OF *Neospora caninum* IN HOLSTEIN COWS IN THE FRANCISCO BELTRÃO REGION OF PARANÁ, BRAZIL**ABSTRACT**

Dairy cattle is one of the main economic activities of Brazil. The protozoa *Neospora caninum* causes great economic losses in this activity, which can be reduced through control methods. To minimize the lack of information about the *N. caninum* in the *Francisco Beltrão* region of Paraná, Brazil, the aim of this study was to analyze the seroprevalence of *N. caninum* and emphasize the importance of diagnosis and the adoption of appropriate management measures. For this 367 serum samples from Holstein cows located in the Francisco Beltrão region of Paraná, Brazil, aged from two to four years were analyzed by indirect immunofluorescence. It was obtained a prevalence of 35.1%. This reveals that the dairy cattle in the region present high frequency of IgG anti-*N. caninum* and independent of the method to be performed, is of highlight realize the diagnosis of this disease so that control measures may be implemented to minimize the losses.

Keywords: dairy cattle, control, epidemiology, protozoa.

¹ Curso de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus São Miguel do Oeste – SC. Contato principal para correspondência.

² Departamento de Grandes Animais, Clínica e Cirurgia de Grandes Animais Universidade Federal de Santa Maria.

³ Curso de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus Xanxerê – SC.

⁴ Nutre Saúde e Produção animal.

EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE *Neospora caninum* EN VACAS DE LA RAZA HOLSTEIN EN LA MICROREGIÓN DE FRANCISCO BELTRÁN, PARANÁ, BRASIL

RESUMEN

El ganado lechero es una de las principales actividades económicas de Brasil con el protozooario *Neospora caninum* que causan grandes pérdidas económicas en esta actividad, que se pueden reducir a través de métodos de control. Para remediar la falta de información sobre la *N. caninum* en la microregión de Francisco Beltrão, el objetivo de este estudio fue analizar la seroprevalencia de *N. caninum* y hacer saber sobre la importancia del diagnóstico y la adopción de medidas de gestión adecuadas. Para esto 367 muestras de suero de vacas Holstein ubicadas en la microregión de Francisco Beltrão, Paraná, Brasil, entre dos y cuatro años, fueron analizadas por inmunofluorescencia indirecta, mostrando la frecuencia de IgG anti-*N. caninum* de 35,1 %. Esto revela que la leche de vacas de esta microregión de Francisco Beltrão frecuencia actual de IgG anti-*N. caninum* elevadas e independiente del método a realizar, es de suma importancia realizar el diagnóstico de esta enfermedad para que medidas de control sean aplicadas y con eso pérdidas minimizadas.

Palabras clave: vacas lecheras, control, epidemiología, protozooario.

A bovinocultura de leite é uma das principais atividades econômicas do Brasil com rebanho de aproximadamente 16 milhões de vacas leiteiras. Nessa atividade, destacam-se os estados de Minas Gerais, Goiás e Paraná como os principais produtores de leite. Somente no Paraná, é mais de 1,5 milhões de vacas leiteiras com produção média de 5,8 litros animal dia, o que torna a bovinocultura de leite a principal fonte de renda de inúmeras famílias. Os bovinos, assim como outras espécies, estão expostos a inúmeras enfermidades as quais reduzem a lucratividade e dificultam o manejo animal, como é o caso da neosporose bovina responsável por perdas econômicas na faixa de 51 mil dólares por ano no Brasil (1).

O *Neospora caninum*, agente etiológico da neosporose bovina, dissemina-se pela via horizontal onde os hospedeiros definitivos (Canídeos) contaminam o ambiente com oocistos e as vacas, hospedeiros intermediários, infectam-se ao ingerir esses oocistos. Ou ainda pela via vertical, quando vacas infectadas transmitem o *N. caninum* à sua prole por via transplacentária, dando origem a neonatos infectados ou persistentemente infectados (2).

O diagnóstico da neosporose bovina é realizado principalmente por meio de métodos de detecção de anticorpos, com destaque para a Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) os quais permitem quantificar os níveis de anticorpos presentes no hospedeiro, ou ainda por métodos mais específicos como a Reação em Cadeia de Polimerase, porém os dois primeiros são os métodos de eleição para o diagnóstico da doença.

Para sanar a carência de informações a respeito do *N. caninum* na microrregião de Francisco Beltrão, o objetivo desse estudo foi analisar a soroprevalência de *N. caninum* na microrregião de Francisco Beltrão e salientar a importância do diagnóstico e da adoção de medidas adequadas de manejo.

Amostras de sangue de 367 vacas da raça Holandesa de propriedades localizadas na microrregião de Francisco Beltrão no estado do Paraná, Brasil, com idade entre dois e quatro anos, foram coletadas por meio de punção de veia coccígea por sistema vacuoteiner em tubos sem anticoagulante. O sangue total obtido foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos para obtenção do soro, os quais foram estocados a -20°C até serem analisados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) buscando detectar a presença de imunoglobulinas da classe G (IgG) anti-*Neospora spp.* (3).

Como antígenos primários, foram utilizados taquizoítas de *N. caninum* da cepa NC-1 cultivados em células da linhagem VERO, e como anticorpo secundário, anti-IgG[®] bovina, conjugado à fluoresceína⁵. Amostras de soro bovino sabidamente positiva e negativa quanto à presença de anticorpos anti-*Neospora* spp. foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. As amostras foram diluídas na titulação de 50 e consideradas positivas quando a fluorescência ocorreu em toda a superfície dos taquizoítas de *N. caninum* e negativas quando a fluorescência foi apical ou ausente (4).

Os dados para quantificação do número de amostras a serem analisadas foi calculado seguindo a fórmula $n = p(1-p) * (Z/E)^2$

Sendo: p = A proporção estimada baseada em estudos prévios

Z = O valor de t de Student para diferentes intervalos de confiança

E = O erro máximo aceito

Admitindo-se um erro de 5% e intervalo de confiança de 95%, com frequência estimada de 16% de acordo com Reichel et al. (1), os resultados da sorologia foram analisados por distribuição de frequência relativa com auxílio do programa GraphPad[®] Prism 5⁶.

A frequência de anticorpos IgG anti-*N. caninum* na microrregião de Francisco Beltrão foi de 35,1% (129/367), valor superior a média nacional em vacas de leite que está relatada em 16,1% (1). Este fato pode ter ocorrido em virtude de que todas as amostras analisadas foram oriundas de animais com idade superior a 24 meses, sendo que segundo o estudo de Guimarães et al. (5) estes apresentam 3,1 vezes mais chance de serem infectados do que animais mais jovens. Além disso, foram utilizadas vacas da raça holandesa, sendo estas mais vulneráveis a infecção por *N. caninum* (*odds ratio* (OR) = 2,13) que raças zebuínas e/ou mestiças (5).

Nessa mesma linha de pensamento, o que pode justificar a presença de 129 animais soropositivos dos 367 analisados em nosso estudo é o fato que todas as propriedades visitadas apresentavam relatos de aborto e presença de cães, sendo esses fatores de risco para a ocorrência de infecção pelo protozoário estudado, com valores de OR de 4,52 e 2,62, respectivamente, segundo estudo realizado na Argélia, onde foram coletados soro de 799 vacas de 87 propriedades (6).

O *N. caninum* está relatado em mais de 10 países como causas de problemas reprodutivos em bovinos, sendo um importante agente causador de perdas econômicas (1), não somente pelo aborto que a neosporose pode causar, como também pela redução na produção de leite (7).

Para adotar medidas para a redução de perdas ocasionadas por esse protozoário, é de suma importância a realização do diagnóstico na propriedade, seja pela coleta de sangue do animal (3) ou ainda por análise individual de leite, que tem como principal vantagem ser de fácil coleta, além de ocasionar menor estresse ao animal se comparado com a coleta de sangue (8).

Com a frequência de anticorpos anti *N. caninum* encontrados nesse estudo (35,1%), é possível adotar estratégias de controle do agente como os descritos por Häslér et al. (9): (i) descarte de animais soropositivos, (ii) tratamento quimioterápico dos neonatos nascidos de vacas soropositivas e (iii) vacinação de todos o rebanho ou ainda (iv) utilização de reprodutores de raças com aptidão a carne.

Todas essas estratégias de controle apresentando vantagens e desvantagens, onde no (i) o fator positivo é eliminar animais que apresentam maior probabilidade de apresentar problemas reprodutivos, tal como aborto, retenção de placenta e metrite (10) e como negativo o descarte, muitas vezes, de animais com bom potencial produtivo e/ou valor agregado. No

⁵ Anti-IgG bovina conjugada com a fluoresceína (FITC): *Affinity Purified Antibody Fluorescein*. Clopper Road 910, Gaithersburg, MD 20878 USA. www.kpl.com.

⁶ GraphPad Software, San Diego, USA.

(ii) e (iii), o principal fator que torna inviável a utilização é a baixa eficácia desses controles, e que atualmente não há vacina comercial anti-*N. caninum* (2). E o (iv) que, em estudos anteriores, apresentou melhores resultados quando comparados a outros sistemas de controle, com índices de custo benefício na faixa de 1,29 (9). Isso em virtude de que o principal mecanismo de disseminação do *N. caninum* em vacas de leite é a via vertical, onde neonatos filhos de vacas soropositivas nascem persistentemente infectados (PI), com possível reativação do protozoário no momento da gestação desses animais PI, e conseqüentemente casos de aborto (2).

Por fim, fica evidente que vacas de leite da microrregião de Francisco Beltrão apresentam frequências de IgG anti-*N. caninum* elevadas e independente do método a ser realizado, é de suma importância o diagnóstico dessa enfermidade para que medidas de controle sejam implementadas e as perdas minimizadas.

REFERÊNCIAS

1. Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LFP, Ellis JT. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. *Int J Parasitol.* 2013;43(2):133-42.
2. Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infect Genet Evol.* 2013;13:133-50.
3. McInnes LM, Ryan UM, O’Handley R, Sager H, Forshaw D, Palmer DG. Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. *Vet Parasitol.* 2006;142(3-4):207-13.
4. Pare J, Hietala SK, Thurmond MC. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 1995;7(2):273-5.
5. Guimarães Jr JS, Souza SLP, Bergamaschi DP, Gennari SM. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. *Vet Parasitol.* 2004;124(1-2):1-8.
6. Ghalmi F, China B, Ghalmi A, Hammitouche D, Losson B. Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. *Res Vet Sci.* 2012;93(2):655-61.
7. González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Carro-Corral C, Mezo M. Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. *Prev Vet Med.* 2011;101(1-2):58-64.
8. Camillo G, Cezar AS, Antonello AM, Sangioni LA, Flores EF, Pereira GR, et al. Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta. *Pesqui Vet Bras.* 2011;31(6):482-6.
9. Häsler B, Regula G, Stärk KDC, Sager H, Gottstein B, Reist M. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. *Prev Vet Med.* 2006;77(3-4):230-53.
10. Asmare K, Regassa F, Robertson LJ, Skjerve E. Seroprevalence of *Neospora caninum* and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia. *Vet Parasitol.* 2013;193(1-3):85-94.

Recebido em: 21/01/2014

Aceito em: 17/08/2015

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA, ELETROCARDIOGRÁFICA E DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA EM GATOS NO PERÍODO PEDIÁTRICO

Úrsula Chaves Guberman¹
Karina Preising Aptekmann²
Pollyanna Zampirolli Costa³
Daniel Capucho Oliveira⁴
Daniel Cometti Borlini⁵
Fabiano Séllos Costa⁶

RESUMO

A avaliação cardiovascular é realizada por meio do exame físico associado aos achados em exames complementares. Após o nascimento, ocorrem mudanças significativas na circulação sanguínea e no próprio coração. Sendo assim, para o diagnóstico de algumas doenças congênitas, é necessário realizar a investigação por meio de anormalidades detectadas nesses exames. O objetivo desse estudo foi obter um padrão de normalidade dos valores obtidos por meio dos exames de radiografia torácica, eletrocardiográfico (ECG) e da pressão arterial sistólica sistêmica (PASS) de gatos em período pediátrico, comparando-os aos valores padrões para adultos. Para isso, foram utilizados filhotes hígidos de gatos aos 15, 30, 45 e 60 dias de vida. Pode-se concluir que, com o desenvolvimento dos gatos, há mudanças nos parâmetros cardíacos avaliados. Ao ECG, a amplitude de R apresentou aumento significativo com o desenvolvimento, assim como os valores de PASS. Apesar do aumento observado, todos os valores obtidos pelo ECG e de PASS estavam dentro do valor de normalidade padronizado para gatos adultos, sugerindo-se que os valores eletrocardiográficos e de PASS utilizados como referência para gatos adultos podem também ser utilizados para esta faixa etária. Constatou-se por meio da radiografia torácica que houve variação na área cardíaca e torácica entre os diferentes momentos, mas não foi significativa a variação nos valores dos eixos cardíacos (curto e longo) e, conseqüentemente, no valor do “*vertebral heartscale*” (VHS). Comparando-se os valores de VHS com gatos adultos, verificou-se que os filhotes apresentam valores superiores.

Palavras-chave: eletrocardiograma, gatos, neonatologia, pressão arterial sistólica, radiografia.

RADIOGRAPHIC, ELECTROCARDIOGRAPHIC AND SYSTEMIC BLOOD PRESSURE EVALUATION IN CATS DURING THE PEDIATRIC PERIOD

ABSTRACT

The cardiovascular evaluation is performed by means of physical examination findings associated with additional tests. After birth, there are significant changes in blood circulation and the heart itself. Thus, for the diagnosis of some congenital diseases is necessary to conduct the investigation of abnormalities detected by these tests. The aim of this study was to obtain a normal range of values obtained by means of chest radiography,

¹ Mestrando em Cirurgia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP- Campus de Botucatu. Contato principal para correspondência.

² Professora Adjunta do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo

³ Residente de Clínica Cirúrgica em Animais de Companhia, Universidade Federal de Minas Gerais

⁴ Mestrando na Área de Diagnóstico por Imagem, Universidade Federal do Paraná

⁵ Mestrando em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo

⁶ Professor Adjunto da Universidade Federal Rural de Pernambuco

electrocardiographic (ECG) and systemic systolic blood pressure (SBP) in cats during the pediatric period, comparing them to the default values for adults. For this reason, these tests were performed on young healthy cats at 15, 30, 45 and 60 days of life. It can be concluded that with the development of cats no change in cardiac parameters measured. Electrocardiographically, the amplitude of R wave increased significantly with development, as well as the SBP. The ECG and SBP values obtained were within normal values standardized for adult cats. It is therefore suggested that the electrocardiographic and SBP values used as reference for adult cats can also be used for this age group. Chest radiography revealed variation in cardiac and thoracic area between the different moments, but there was no significant variation in the values of the cardiac axes (short and long) and, consequently, the value of vertebral heart scale (VHS). It was observed that VHS values from kittens were higher than VHS values from adult cats.

Keywords: electrocardiogram, cats, neonatology, systolic blood pressure, radiograph.

EVALUACIÓN RADIOGRÁFICA, ELECTROCARDIOGRÁFICA Y PRESIÓN ARTERIAL SISTÉMICA EN LOS GATOS DURANTE EL PERIODO DE PEDIATRÍA

RESUMEN

La evaluación cardiovascular se realiza por medio del examen físico em asociación com hallazgos em lós exámenes complementares. Después Del nacimiento cambios significativos ocurren em La circulación sanguínea y em El corazón. Por lo tanto, para el diagnóstico de ciertas enfermedades congénitas es necesario La investigación por medio de las anomalías detectadas em dichos exámenes. El objetivo de esta investigación fue presentar un rango de normalidad de los valores obtenidos por medio de radiografía de tórax, eletrocardiograma (ECG) y presión arterial sistémica (PAS) de gatos durante el período de pediatría, comparandolos com el rango de valores para gatos adultos. Se utilizaran cachorros de gatos sanos con 15, 30, 45 y 60 días de vida. Se puede concluir que com El desarrollo de los gatos hay câmbios em lós parámetros cardíacos evaluados. En el ECG, La amplitud de R presentó incremento significativo com El desarrollo, así como los valores de PAS. A pesar del incremento observado, todos los valores obtenidos pelo ECG y PAS estaban dentro del rango de normalidad para gatos adultos, lo que sugere que los valores eletrocardiográficos y de PAS del rango de gatos adultos sirve como referencia también para este grupo de edad. Se verificó por medio de radiografía de tórax que ocurre variación en la área cardíaca y la área del tórax dentre los diferentes momentos, pero La variación de los valores de losejes cardíacos (corto y largo) no fue significativa y, por consecuencia, el valor del "vertebral heartscale" (VHS). Em la comparación de los valores de VHS com los valores de gatos adultos, se verificó que los cachorros presentan valores más altos.

Palabras clave: eletrocardiograma, gatos, neonatología, presión arterial sistólica, radiografía.

INTRODUÇÃO

A fisiologia cardíaca dos gatos ao nascer difere da dos adultos (1). Em filhotes de cães, os parâmetros fisiológicos se modificam simultânea e progressivamente, durante os primeiros sete meses de idade, para valores equivalentes aos de um adulto (2). Após o nascimento, a anatomia cardíaca e dos grandes vasos sofrem mudanças para permitir mais eficiência na circulação venosa e arterial (3).

A determinação dos parâmetros eletrocardiográficos e radiográficos, bem como a aferição da pressão arterial sistólica sistêmica (PASS) de gatos jovens são essenciais para o estabelecimento de valores de referência, auxiliando no diagnóstico de doenças cardíacas congênitas. Objetivou-se com este trabalho realizar uma avaliação cardiovascular de gatos com 15, 30, 45 e 60 dias de idade por meio da realização de exames eletrocardiográficos, radiográficos e aferição da PASS.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste projeto de pesquisa, foram utilizados filhotes de gatos hípidos provenientes de ninhadas distintas e nascidos de parto eutócico. Para a inclusão dos animais no grupo experimental, o exame clínico completo foi realizado nos neonatos, conforme descrito na literatura (4). Para a execução do estudo, utilizaram-se animais oriundos do gatil da instituição, sendo que todos os filhotes e fêmeas lactantes foram mantidos no gatil, receberam ração e água *ad libitum*, além de serem vermifugados e vacinados. Este estudo seguiu as normas de bem-estar animais e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), sob o protocolo n. 038/2010.

Os exames eletrocardiográficos e a determinação da PASS foram realizados em 14 gatos e os radiográficos em oito gatos, em quatro momentos distintos, aos 15, 30, 45 e 60 dias de idade dos filhotes.

A PASS foi aferida por método indireto, utilizando-se o aparelho de Doppler vascular (Microem[®] DV10, Microem Ltda, BR), de acordo com estudos anteriores (5). Realizou-se a tricotomia na região da artéria digital palmar esquerda e colocado gel para aumentar o contato entre o transdutor e a pele. O exame foi realizado com o manguito neonatal (n^o1), que foi insuflado até se obter uma pressão cerca de 30 a 40 mmHg acima da PASS esperada. À medida que o manguito era desinflado, a PASS foi determinada a partir do primeiro som audível. Uma média de cinco aferições da PASS foi realizada para determinar o valor para cada animal.

Um eletrocardiógrafo computadorizado (TEB[®] ECG-PC, Tecnologia Eletrônica Brasileira Ltda, BR) foi utilizado para a realização dos eletrocardiogramas (ECG). Os gatos foram contidos fisicamente em decúbito lateral direito e os eletrodos foram posicionados segundo recomendações de Tilley (6). A monitorização eletrocardiográfica teve a duração média de um minuto e o traçado foi arquivado no computador, impresso em papel e, posteriormente, analisado. Foram avaliadas as derivações bipolares (I, II, III) e unipolares de membros (aVF, aVR, aVL). Determinaram-se ritmo, frequência cardíaca, eixo cardíaco, durações em segundos(s) de P, PR, QRS, QT, amplitudes em milivolts (mV) de P, Q, R, T e desvio do segmento ST em relação à linha de base.

Para a radiografia torácica, foram realizadas duas projeções perpendiculares entre si, uma lateral e outra ventrodorsal, utilizando-se o equipamento Diafix 500 mA/125 kV. A colimação dos raios-x abrangeu da primeira costela até após a última vértebra lombar. Para a projeção lateral, o filhote foi posicionado em decúbito lateral direito, com os membros torácicos tracionados cranialmente e o pescoço esticado. Para a projeção ventrodorsal, realizou-se decúbito dorsal, com os membros torácicos tracionados cranialmente, de modo que o esterno se sobreponha à coluna vertebral torácica. Em ambas as projeções, o feixe de raios-X foi direcionado para o quinto espaço intercostal, no pico inspiratório máximo. Foram utilizadas técnicas radiográficas compatíveis com a espessura do tórax de cada gato, em cada momento do experimento.

Cada radiografia foi digitalizada e analisada com o programa Adobe Photoshop CS4[®], com a análise da silhueta cardíaca, área cardíaca (AC) e torácica (AT) e estabelecida a relação entre a área cardíaca e a torácica (AC:AT); estabelecido o eixo cardíaco longo (ECL), eixo cardíaco curto (ECC) e o tamanho cardíaco vertebral (VHS). As mensurações do VHS foram

realizadas em projeções laterais, conforme metodologia descrita por Ghadiriet al. (7) e Litster e Buchanan (8).

Após a coleta de dados, realizou-se a análise estatística das variáveis entre os momentos pelo teste de ANOVA de Tuckey, com nível de significância de 5%. Os valores obtidos foram comparados com os valores de normalidade para gatos adultos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Eletrocardiograma. A média e o desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos dos gatos aos 15, 30, 45 e 60 dias estão representados na Tabela 1. Por meio da avaliação dos traçados eletrocardiográficos, observou-se que os gatos apresentaram taquicardia sinusal aos 15 e 30 dias de avaliação e ritmo sinusal aos 45 e 60 dias. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os valores médios de frequência cardíaca (FC) entre os quatro momentos avaliados, que variou de 160 a 300bpm (média 229 ± 29 bpm). Aos 15 e 30 dias, a média da FC observada foi acima dos padrões de normalidade para gatos adultos, porém, considerado normal para gatos filhotes (6). Estudos eletrocardiográficos em filhotes de cães demonstraram que a FC diminui gradativamente até os seis ou sete meses de idade, variando com a raça estudada (9,10).

Tabela 1. Parâmetros eletrocardiográficos (média \pm desvio padrão) de gatos (n=14) com 15, 30, 45 e 60 dias de idade.

Parâmetros eletrocardiográficos	Idade dos gatos				Padrão do gato adulto**
	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	
Onda P (s)	0,034 \pm 0,005	0,036 \pm 0,009	0,038 \pm 0,007	0,036 \pm 0,005	<0,04
Onda P (mV)	0,096 \pm 0,022	0,120 \pm 0,043	0,190 \pm 0,155	0,150 \pm 0,183	<0,2
Intervalo PR (s)	0,061 \pm 0,009	0,067 \pm 0,008	0,071 \pm 0,009	0,062 \pm 0,008	0,05-0,09
Complexo QRS (s)	0,037 \pm 0,007	0,045 \pm 0,007	0,048 \pm 0,013	0,047 \pm 0,016	<0,04
Onda Q (mV)	---	---	---	0,100 \pm 0,071	Não reportado
Onda R (mV)	0,107 \pm 0,070*	0,179 \pm 0,106	0,280 \pm 0,158*	0,190 \pm 0,071	<0,9
Onda S (mV)	0,110 \pm 0,055	0,150 \pm 0,03	0,099 \pm 0,047	0,036 \pm 0,029	Não reportado
Intervalo Q-T (s)	0,150 \pm 0,026	0,151 \pm 0,023	0,153 \pm 0,020	0,162 \pm 0,019	0,12-0,18
Onda T (mV)	0,180 \pm 0,265	0,107 \pm 0,06	0,124 \pm 0,076	0,175 \pm 0,202	<0,3
FC (bpm)	234 \pm 28,747	280 \pm 35,4	226 \pm 22,188	218 \pm 29,957	120-240

Legenda: s - segundos; mV- milivolts; FC - frequência cardíaca.* Valores considerados significativamente diferentes entre os momentos, com nível de significância de 5%.

A morfologia do complexo QRS alterou de acordo com o desenvolvimento fisiológico dos gatos, sendo diferente da observada em gatos adultos. Em gatos adultos, comumente, observa-se a conformação “qRs” (6), e neste estudo se verificou uma conformação “rS”, conforme ilustrado na Figura 1. Avaliando-se o ECG no crescimento de cães da raça em Mastin-Espanhol, Bernal et al. (9) verificaram que a morfologia do QRS altera de “qrS” e “rS” para “qR” e “qRs” durante as primeiras duas semanas de vida. A conformação qrS foi observada em outro estudo com filhotes de gatos, sendo prevalente, principalmente, na primeira semana de vida (11). Esta diferença de conformação do QRS se explica pela mudança progressiva da massa relativa do ventrículo direito e esquerdo na razão de 1:1 ao nascimento para 1:2 a 1:3 no adulto (2).

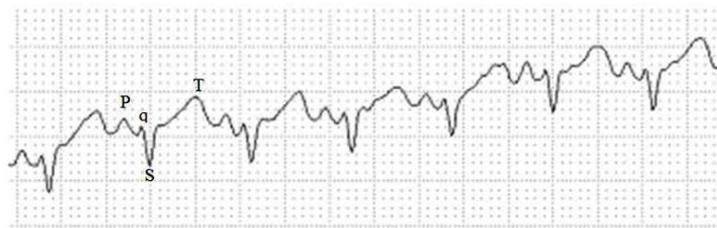


Figura 1. Traçado eletrocardiográfico na Derivação II (2N, 50mm/s) de gato aos 30 dias de vida, evidenciando a morfologia do complexo QRS do tipo rS.

A onda Q só foi evidenciada aos 60 dias de idade, em apenas quatro filhotes de gatos (29%), diferindo dos resultados de Avizehet al. (10) que observaram a presença da onda Q desde a primeira semana de vida em 90% dos filhotes de cães avaliados, podendo haver diferenças entre filhotes de cães e gatos.

A amplitude da onda R aumentou com a idade, assim como observado em outros estudos (9-12), havendo diferença significativa ($P < 0,05$) entre os animais de 15 e 45 dias de idade. Este aumento pode ser explicado pelo desenvolvimento ventricular esquerdo que ocorre com a idade (2,3), uma vez que a amplitude da onda R representa a despolarização ventricular (6).

A amplitude de S sofreu um decréscimo durante os 60 dias, provavelmente devido à hipertrofia do ventrículo esquerdo e diminuição do ventrículo direito (2).

A partir da determinação do eixo cardíaco, foi observado um desvio de eixo cardíaco à direita, que reduziu com o desenvolvimento dos filhotes. Aos 15 dias de vida, sete gatos (50%) apresentaram desvio à direita; aos 30 dias, cinco gatos (35%); aos 45 dias, dois gatos (14%); e aos 60 dias, apenas um gato (7%) permaneceu com desvio de eixo à direita. O desvio de eixo cardíaco para direita também foi relatado em outros estudos com neonatos, tanto em cães, quanto em gatos (11-13). Há relato na literatura de filhotes de cães cardiopatas em que não houve alteração do eixo cardíaco durante as primeiras semanas de idade (14), sendo que esta diferença pode ser ocasionada pela diminuição do desenvolvimento do ventrículo esquerdo nestes casos. A alteração do eixo também pode ser explicada devido à hipertrofia do ventrículo esquerdo, de acordo com mudanças ocorridas com o desenvolvimento do animal (2,13).

A onda T permaneceu com a mesma polaridade (positiva) durante todos os momentos. Bernal et al. (9) observaram que, em filhotes de cães, a onda T aumenta progressivamente de amplitude até os dois meses de idade e muda a polaridade (de negativa para positiva) até os cinco meses de idade.

Assim como em estudo realizado por Lourenço e Ferreira (12), os valores eletrocardiográficos encontrados neste estudo não diferiram do padrão estabelecido na literatura para gatos adultos, possibilitando a utilização dos valores de referência de gatos adultos para a avaliação de gatos filhotes, contudo deve-se atentar para a diferença na conformação do complexo QRS e alteração do eixo cardíaco.

Pressão Arterial Sistólica Sistêmica. As médias dos valores de PASS em cada momento avaliado estão ilustradas na Tabela 2. Observou-se que a PASS aumentou com a idade dos gatos. Houve diferença significativa entre a PASS aos 15 dias comparado com os valores encontrados aos 30, 45 e 60 dias de idade. O valor obtido nos quatro momentos do estudo manteve-se dentro dos valores de normalidade para gatos adultos, em que o valor máximo é de 150 mmHg (15). Podem-se utilizar os valores encontrados neste estudo para

determinar os valores de PASS mínimos para gatos até 60 dias de idade. A falta de técnicas uniformes de aferição e limiares inconsistentes para estabelecer valores normais de PASS em felinos torna difícil discutir os resultados encontrados.

Tabela 2. Valores médios da PAS de gatos (n=14) com 15, 30, 45 e 60 de idade.

Dias de vida	Média da PAS (mmHg)
15	88,8±17,9 ^a
30	109,4±16,1 ^b
45	120,4±20,4 ^b
60	126,5±20,9 ^b

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (p<0,05).

Radiografias. Por meio da análise das radiografias torácicas, as medições foram realizadas nas projeções lateral e ventrodorsal, que estão representadas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Analisando-se as radiografias quanto às áreas avaliadas, pode-se notar que nas duas projeções, as áreas cardíaca e torácica aumentaram de forma progressiva com o avançar da idade, apresentando diferença significativa ($P<0,05$) entre os momentos. Entretanto, essas áreas aumentaram com a mesma proporção, pois a relação entre elas não diferiu significativamente ($P>0,05$).

Tabela 3. Medidas do tamanho relativo do coração de gatos (n=8), utilizando o sistema de escala vertebral, em radiografias na projeção lateral (média ± desvio padrão).

Variáveis	Idade dos gatos			
	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
ECC (v)	4,14±0,37	4,24±0,32	4,18±0,27	3,96±0,26
ECL (v)	5,67±0,38	5,85±0,38	6,13±0,41	5,79±0,38
VHS (v)	9,81±0,61	10,09±0,58	10,31±0,63	9,75±0,44
AC (cm ²)	2,32±0,10*	3,36±0,35*	4,06±0,98*	5,01±1,41*
AT (cm ²)	8,37±0,70*	12,06±1,32*	14,03±3,16*	18,39±5,27*
AC-AT (%)	27,84±1,89	27,89±1,42	28,93±2,84	27,42±2,55

Legenda: ECC= Eixo Cardíaco Curto; ECL= Eixo Cardíaco Longo; VHS= Tamanho cardíaco vertebral; AC= Área Cardíaca; AT: Área Torácica; AC:AT= Proporção que o coração ocupa no tórax. *Valores considerados significativamente diferentes entre os momentos, com nível de significância de 5%.

Tabela 4. Medidas do tamanho relativo do coração de gatos (n=8), utilizando o sistema de escala vertebral, em radiografias na projeção ventrodorsal (média ± desvio padrão).

Variáveis	Idade dos gatos			
	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
AC (cm ²)	2,80±0,32*	4,02±0,31*	4,48±0,94*	5,95±1,61*
AT (cm ²)	9,01±0,99*	13,72±3,37*	14,36±1,47*	18,46±3,19*
AC-AT (%)	31,23±3,59	30,35±6,74	31,21±6,36	31,78±4,12

Legenda: AC= Área Cardíaca; AT: Área Torácica; AC:AT= Proporção que o coração ocupa no tórax. *Valores considerados significativamente diferentes entre os momentos, com nível de significância de 5%.

O desenvolvimento do tórax e do coração ocorre de maneira concomitante nos primeiros 60 dias de vida. Seria preciso continuar o estudo, acompanhando os animais radiograficamente, para verificar em que momento o tórax tem o crescimento enfatizado. Não foram encontrados valores na literatura para gatos adultos.

Não houve diferença significativa nos valores de ECC, ECL e VHS nos diferentes momentos avaliados (Tabela 3). Os valores médios do VHS em todos os momentos foram

superiores aos valores encontrados na literatura para gatos adultos ($7,5\pm 0,3v$) (16).

CONCLUSÕES

Por meio da análise do ECG, conclui-se que os valores eletrocardiográficos utilizados como referência para gatos adultos também podem ser utilizados para gatos filhotes, contudo, deve-se atentar para algumas particularidades, como a presença do complexo QRS com conformação rS, desvio de eixo cardíaco à direita e frequência cardíaca elevada. A PASS aumenta gradativamente de acordo com o desenvolvimento dos gatos, porém, sem ultrapassar os limites de normalidade para gatos adultos. Na avaliação radiográfica, verifica-se que os valores mensurados pelo sistema VHS se mostram acima daqueles sugeridos na literatura para gatos adultos e que o crescimento das áreas cardíaca e torácica ocorre de maneira simultânea até os 60 dias de vida.

COMISSÃO DE BIOÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo, sob protocolo n.038/2010.

REFERÊNCIAS

1. Cunningham JG. Gestação e parto. In: Fisiologia veterinária. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 409-16.
2. Bright JM. The cardiovascular system. In: Hoskins JD. Veterinary pediatrics: dogs and cats from birth to six months. 3a ed. Philadelphia: WB Saunders; 2001. p. 103-34.
3. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. Sistema cardiovascular. In: Tratado de anatomia veterinária. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 245-6.
4. Hoskins JD, Partington BP. Physical examination and diagnostic imaging procedures. In: Veterinary pediatrics: dogs and cats from birth to six months. 3a ed. Philadelphia: WB Saunders; 2001. p. 1-21.
5. Ware AW. Hipertensão arterial sistêmica. In: Nelson RW, Couto CG. Medicina interna de pequenos animais. 3a ed. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier; 2006. p. 193-202.
6. Tilley LP. Essentials of canine and feline electrocardiography: interpretation and treatment. 3a ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992. 470 p.
7. Ghadiri A, Avizeh R, Rasekh A, Yadegari A. Radiographic measurement of vertebral heart size in healthy stray cats. J Feline Med Surg. 2008;10:61-5.
8. Litster AL, Buchanan JW. Vertebral scale system to measure heart size in radiographs of cats. J Am Vet Med Assoc. 2000;216:210-4.
9. Bernal LJ, Montes AM, Fernández MJP, Gutierrez CP. Electrocardiographic changes in the growing mastin-espanol. J Small Anim Pract. 1995;36:221-8.

10. Avizeh R, Papahn AA, Ranjbar R, Rasekn AR, Molae R. Electrocardiographic changes in the littermate mongrel dogs from birth to six months of life. *Iranian J Vet Res.* 2010;11:304-8.
11. Nogueira SSS, Faria EG, Sousa MG. Avaliação do eletrocardiograma em cães e gatos neonatos. *MEDVEP Rev Cient Med Vet.* 2010;8:101-7.
12. Lourenço MLG, Ferreira H. Electrocardiographic evolution in cats from birth to 30 days of age. *Can Vet J.* 2003;44:914-7.
13. Trautvetter E, Detweiler DK, Patterson DF. Evolution of the electrocardiogram in young dogs during the first 12 weeks of life. *J Electrocardiol.* 1981;14:267-73.
14. Trautvetter E, Detweiler DK, Bohn FK, Patterson DF. Evaluation of the electrocardiogram in young dogs with congenital heart disease leading to right ventricular hypertrophy. *J Electrocardiol.* 1981;14:275-82.
15. Brown S, Atkins C, Bagley R, Carr A, Cowgill L, Davidson M, et al. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *ACVIM Consensus Statement. J Vet Intern Med.* 2007;21:542-58.
16. Litster AL, Buchanan JW. Radiographic and echocardiographic measurement of the obese cats. *Vet Radiol Ultrasound.* 2000;41:320-5.

Recebido em: 19/03/2014

Aceito em: 24/04/2015

OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM FELINOS DE RECIFE, PE, BRASIL

Giselle Ramos da Silva¹
Ivanise Maria de Santana¹
Ana Carolina Messias de Souza Ferreira¹
João Carlos Gomes Borges¹
Leucio Câmara Alves²
Maria Aparecida da Gloria Faustino³

RESUMO

Cryptosporidium spp. são protozoários, parasitos intracelulares obrigatórios do epitélio do trato gastrointestinal, causadores da criptosporidiose, possuindo ampla variedade de hospedeiros e grande capacidade de reprodução e disseminação. Pouco se conhece sobre a infecção por *Cryptosporidium* spp. na espécie felina e diante da importância dos gatos como animais de companhia, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e a associação com fatores epidemiológicos e sanitários relacionados ao manejo de felinos domésticos na cidade do Recife, estado de Pernambuco, Brasil. Amostras de fezes de 32 felinos domésticos foram submetidas à técnica de centrífugo-sedimentação em formol-éter com posterior coloração pelo método de Kinyoun. Uma ficha foi preenchida para obtenção de informações sobre as medidas adotadas na criação dos animais. A análise estatística foi realizada pelo teste Exato de Fisher, com nível de significância de 5,0%. Foi observada taxa de infecção de 18,8% (6/32), havendo associação significativa com a vacina recebida e convívio com outros animais. Trata-se do primeiro registro de ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. na espécie felina no Nordeste brasileiro.

Palavras-chave: Criptosporidiose, zoonose, epidemiologia, gatos.

OCCURRENCE OF *Cryptosporidium* spp. IN FELINE FROM RECIFE, PERNAMBUCO STATE, BRAZIL**ABSTRACT**

The genus *Cryptosporidium* consists of an obligate intracellular protozoan of the epithelium of the gastrointestinal tract, causing cryptosporidiosis that presents a wide range of hosts and great capacity of reproduction and dissemination. Little is known about the infection by *Cryptosporidium* spp. in feline species and considering the importance of cats as pets, the present study aimed to evaluate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. and its association with epidemiological and health factors related to the management of domestic cats in the city of Recife, state of Pernambuco, Brazil. Stool samples from 32 domestic cats were subjected to centrifugal sedimentation technique in formalin-ether with subsequent staining by Kinyoun method. A *check list* was completed to obtain information on the measures adopted in animal husbandry. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test, with significance level of 5.0%. Infection rate of 18.8% (6/32) was observed and significant association with the vaccine received and contact with other animals. This is the first report of infection by *Cryptosporidium* spp. in feline species in the Brazilian Northeast.

¹ Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária Universidade Federal Rural de Pernambuco, Contato principal para correspondência.

² Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

³ Profa. Dra. Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco

Keywords: Cryptosporidiosis, zoonosis, epidemiology, feline.

OCURRENCIA DE *Cryptosporidium* spp. EN FELINO DE RECIFE, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

RESUMEN

Cryptosporidium spp. son protozoarios, parásitos obligados intracelulares del epitelio del tracto gastrointestinal, haciendo que la criptosporidiosis, con amplia variedad de hospederos y gran capacidad de reproducción y difusión. Poco se sabe acerca de la infección por *Cryptosporidium* spp. en especies de felinos y considerando la importancia de los gatos como animales de compañía, este estudio tuvo como objetivo evaluar la infección por *Cryptosporidium* spp. y la asociación de factores epidemiológicos y de salud relacionados con el manejo de los gatos en la ciudad de Recife, estado de Pernambuco, Brasil. Muestras de heces de 32 gatos fueron sometidos a la técnica de sedimentación centrífuga en formol-éter con posterior tinción usando el método Kinyoun. Una lista de verificación se completó para obtener información sobre las medidas adoptadas en la cría de animales. Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba exacta de Fisher, con un nivel de significación del 5,0%. Se observó la tasa de infección del 18,8% (6/32), hubo una asociación significativa con la vacuna recibida y el contacto con otros animales. Este es el primer registro de la aparición de la infección por *Cryptosporidium* spp. en especies de felinos en el noreste de Brasil.

Palabras clave: criptosporidiosis, zoonosis, epidemiología, gatos.

INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptosporidium* é constituído por protozoários, parasitos intracelulares obrigatórios do epitélio do trato gastrintestinal, causadores da criptosporidiose. Possuem ampla variedade de hospedeiros e grande capacidade de reprodução e disseminação (1,2). O primeiro relato de criptosporidiose em felinos foi realizado por Iseki (3) em que foi descrita a presença de oocistos nas fezes desses animais.

A transmissão de *Cryptosporidium* spp. pode ocorrer de forma indireta com a ingestão de água e alimentos contaminados contendo oocistos viáveis. Diretamente, a transmissão pode ocorrer entre animais, entre humanos ou entre animais e humanos (4), pela ingestão acidental de oocistos contidos nas fezes de hospedeiros infectados. Os mesmos oocistos também podem ser transportados pelo ar, insetos ou vestuário (5).

Felinos tem características comportamentais peculiares tais como habilidade para viver dentro de lares em ambientes urbanos, hábitos de limpeza, natureza sociável, tolerância para permanecerem sozinhos, além do pequeno porte (6). Tais características tem aumentado sua popularidade.

Atualmente os gatos estão entre os animais de companhia mais comuns no Brasil e no mundo, porém, apesar disso, estudos envolvendo a ocorrência de parasitos gastrintestinais nesses animais, quando comparados à espécie canina, ainda são escassos (7).

Alguns estudos destacam o gato como hospedeiro de protozoários com potencial zoonótico como o gênero *Cryptosporidium* (8,9,10), podendo ser parasitados por *Cryptosporidium parvum*, *C. muris* e *C. felis* (11).

Na espécie felina, semelhantemente ao ocorrido em outras espécies, indivíduos muito jovens ou idosos e pacientes com algum comprometimento imunológico são os mais severamente afetados por *Cryptosporidium* spp. (12,13).

Diante da importância dos felinos como animais de companhia, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e a associação com fatores epidemiológicos e sanitários relacionados ao manejo de felinos de companhia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras fecais de 32 gatos domiciliados, de ambos os sexos, raças e idades variadas, pertencentes a tutores residentes na cidade do Recife, selecionados por amostragem por conveniência (14). As coletas foram realizadas nas residências entre os meses de dezembro de 2012 e junho de 2013.

Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foi preenchida uma ficha individual contendo dados para identificação e informações relacionadas aos animais como idade, sexo e raça. Outras variáveis como ambiente de criação, tipo de alimentação e escore corporal também foram avaliadas. O escore corporal foi avaliado por meio da inspeção visual do animal, classificando-se o Escore de Condição Corporal (ECC) de acordo com a escala proposta por Laflamme (15).

A coleta de amostras fecais dos animais foi realizada pelos proprietários, de acordo com orientações previamente transmitidas, sendo coletadas após emissão espontânea, desprezando-se a porção em contato com o solo ou com material contido nas caixas de areia e transferidas para recipientes plásticos, devidamente identificados. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, encaminhadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos - Departamento de Medicina Veterinária (DMV) - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e conservadas em formalina tamponada 10% sob refrigeração a 4°C para posterior processamento.

Para a concentração dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. o material biológico foi submetido à técnica de centrífugo-sedimentação em formol-éter (16,17). As amostras formolizadas foram então submetidas à identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. por meio de esfregaços fecais (18). Para tanto, dois gramas de cada amostra fecal foram pesados e fixados em 10mL de solução de formalina 10%. Após homogeneização, a solução foi tamizada em gaze com quatro dobras, sendo, então recuperados 2mL de cada solução e transferidos individualmente para tubos cônicos com capacidade para 10mL, adicionados 6mL de solução de formalina 10% e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, foram adicionados 3mL de solução de formalina 10% e 3mL de éter etílico, ressuspendendo-se o sedimento no fundo do tubo. Procedeu-se novamente centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante oriundo da segunda centrifugação, foram feitos, com auxílio de bastão de vidro, esfregaços em lâminas de microscopia a partir dos sedimentos resultantes de cada amostra.

Após 24 horas de secagem, as lâminas foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada ou Kinyoun (19), e procedeu-se a leitura em microscópio óptico, em objetiva de 40x com posterior confirmação na objetiva de 100x sob imersão.

Os dados foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel[®] versão 2007 obtendo-se as distribuições absolutas e percentuais de cada parâmetro analisado.

Cálculos estatísticos foram realizados por meio do software IBM SPSS[®] (*Statistical Package for the Social Sciences* - Inc. in Chicago, Illinois) na versão 21. A margem de erro utilizada nas decisões dos testes estatísticos foi de 5,0% e os intervalos foram obtidos com 95,0% de confiança.

Valores da associação entre as variáveis foram calculados por meio do teste Exato de Fisher. Para avaliação da força de associação entre os cruzamentos das variáveis, foi obtido o valor do *Odds Ratio* (OR) com respectivo intervalo de confiança (IC=95%).

RESULTADOS

Tabela 1. Frequência absoluta (n) e relativa (%) de felinos domésticos submetidos à pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em relação à idade, sexo e raça dos animais. Recife - PE, 2013.

Variável	<i>Cryptosporidium</i> spp.						Valor de p
	Positivo		Negativo		TOTAL		
	n	%	n	%	n	%	
Total	6	18,8	26	81,3	32	100,0	
Idade (anos)							
≤ 1	3	23,1	10	76,9	13	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,242
2 – 3	2	40,0	3	60,0	5	100,0	
4 – 5	1	20,0	4	80,0	5	100,0	
> 5	-	-	9	100,0	9	100,0	
Sexo							
Macho	4	33,3	8	66,7	12	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,165
Fêmea	2	10,0	18	90,0	20	100,0	
Raça							
SRD	5	16,7	25	83,3	30	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,345
CRD	1	50,0	1	50,0	2	100,0	

(SRD): Sem raça definida (CRD): Com raça definida (1): Teste Exato de Fisher. (*): Diferença significativa ao nível de 5,0%. Não foi possível determinar o *Odds Ratio* devido à ocorrência de frequências nulas e muito baixas.

Tabela 2. Frequência absoluta (n) e relativa (%) de felinos domésticos submetidos à pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. considerando as variáveis tipo de alimento, estado nutricional e assistência veterinária. Recife - PE, 2013.

Variável	<i>Cryptosporidium</i> spp.						Valor de p
	Positivo		Negativo		TOTAL		
	n	%	n	%	n	%	
Total	6	18,8	26	81,3	32	100,0	
Alimento							
Alimento Industrializado	6	21,4	22	78,6	28	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,566
Comida Caseira + Alimento Industrializado	-	-	4	100,0	4	100,0	
Estado Nutricional							
Ideal	5	16,1	26	83,9	31	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,188
Subalimentado	1	100,0	-	-	1	100,0	
Sobrealimentado	-	-	-	-	-	-	
Assistência Médico-Veterinária							
Sim	1	7,1	13	92,9	14	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,196
Não	5	27,8	13	72,2	18	100,0	

(1): Teste Exato de Fisher.

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

Não foi possível determinar o *Odds Ratio* devido à ocorrência de frequências nulas e muito baixas.

Tabela 3. Frequência absoluta (n) e relativa (%) de felinos domésticos submetidos à pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. considerando as variáveis quadros diarreicos, amostras diarreicas, exame coproparasitológico, vermifugação e vacina recebida. Recife - PE, 2013.

Variável	<i>Cryptosporidium</i> spp.						Valor de p	OR (IC a 95%)
	Positivo		Negativo		TOTAL			
	n	%	n	%	n	%		
Total	6	18,8	26	81,3	32	100,0		
Quadros diarreicos								
Sim	3	18,8	13	81,3	16	100,0	$p^{(1)} = 1,000$	1,00
Não	3	18,8	13	81,3	16	100,0		1,00 (0,17 a 5,90)
Coleta/fezes diarreicas								
Sim	-	-	8	100,0	8	100,0	$p^{(1)} = 0,296$	**
Não	6	25,0	18	75,0	24	100,0		
Exame coproparasitológico								
Sim	-	-	1	100,0	1	100,0	$p^{(1)} = 1,000$	
Não	6	19,4	25	80,6	31	100,0		**
Vermifugação								
Sim	2	9,1	20	90,9	22	100,0	$p^{(1)} = 0,060$	**
Não	4	40,0	6	60,0	10	100,0		
Vacina recebida								
Antirrábica	5	55,6	4	44,4	9	100,0	$p^{(1)} = 0,005^*$	**
Antirrábica + Polivalente	-	-	8	100,0	8	100,0		**
Não realiza vacinação	1	6,7	14	93,3	15	100,0		**

(1): Teste Exato de Fisher.

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(**): Não foi possível determinar devido à ocorrência de frequências nulas e muito baixas.

Tabela 4. Frequência absoluta (n) e relativa (%) de felinos domésticos submetidos à pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. segundo o tipo de ambiente de criação, tipo de quintal/gatil, coleta das fezes, convivência com outros animais e convivência específica com cães. Recife - PE, 2013.

Variável	<i>Cryptosporidium</i> spp.						Valor de p	OR (IC a 95%)
	Positivo		Negativo		TOTAL			
	n	%	n	%	n	%		
Total	6	18,8	26	81,3	32	100,0		
Ambiente de criação								
Dentro da residência	2	20,0	8	80,0	10	100,0	p ⁽¹⁾ =1,000	**
Residência + Quintal	3	18,8	13	81,3	16	100,0		**
Residência + Quintal + Livre acesso à rua	1	16,7	5	83,3	6	100,0		**
Tipo de quintal/ gatil								
Cimentado	5	17,9	23	82,1	28	100,0	p ⁽¹⁾ =0,584	**
Terra	1	50,0	1	50,0	2	100,0		**
Terra + Cimentado	-	-	2	100,0	2	100,0		**
Coleta das fezes do animal								
Sim	4	13,8	25	86,2	29	100,0	p ⁽¹⁾ =0,083	**
Não	2	66,7	1	33,3	3	100,0		**
Convivência com outros animais								
Sim	3	10,7	25	89,3	28	100,0	p ⁽¹⁾ =0,015*	**
Não	3	75,0	1	25,0	4	100,0		**
Convivência específica com cães								
Sim	3	15,0	17	85,0	20	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,647	1,00
Não	3	25,0	9	75,0	12	100,0		1,89 (0,31 a 11,34)

(1): Teste Exato de Fisher.

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(**): Não foi possível determinar devido à ocorrência de frequências nulas e muito baixas.

DISCUSSÃO

A partir das amostras analisadas identificou-se a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 18,8% (6/32) dos felinos (Tab.1), sendo este o primeiro registro de ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na região Nordeste do Brasil para a referida espécie animal.

A positividade de felinos para *Cryptosporidium* spp. foi superior à reportada em diversos estudos já realizados no Brasil e no mundo. Retrospectivamente, para a mesma espécie animal, Arai et al. (20) em estudo realizado no Japão obtiveram prevalência de 3,8% de *Cryptosporidium* spp. Mtambo et al. (9), no Reino Unido, detectaram 8,1% de positividade. Nash et al. (21) observaram, em pesquisa realizada na Escócia, 12,3% de felinos positivos. No entanto, Rambozzi et al. (22), em Turin – Itália, relataram positividade superior (24,5%) à do presente estudo.

No Brasil, Gennari et al.(23), na cidade de São Paulo - SP, verificaram positividade de 14,44%. Ragozo et al. (24) observaram 1,45% de gatos positivos nas cidades de São Paulo e Guarulhos-SP. Em Andradina-SP, Coelho et al. (25) detectaram 3,9%, e Ferreira et al. (26) no município de Teresópolis-RJ obtiveram 12,7% de positividade, sendo as frequências citadas,

inferiores quando comparadas com o resultado obtido no presente estudo. As variações de prevalência de *Cryptosporidium* spp. em felinos entre os estudos realizados podem ser devidas ao aprimoramento de metodologias empregadas em pesquisa, técnicas utilizadas ou ainda, devido às diferenciadas condições ambientais entre as regiões e o tipo de manejo animal.

Não se observou associação significativa relacionada à idade do animal e a presença de oocistos nas fezes dos gatos analisados (Tab. 1), concordando com Coelho et al. (25). Diferentemente dos resultados ora encontrados, Rambozzi et al. (22) observaram positividade de 33,3% para felinos com menos de um ano de idade, apresentando diferença significativa, afirmando que os animais jovens são mais susceptíveis à infecções, provavelmente pela presença de um sistema imunológico imaturo e à ausência de imunidade proveniente de exposições anteriores (22).

Não houve associação significativa entre a positividade para *Cryptosporidium* spp. e o sexo dos felinos (Tab. 1). Resultados semelhantes foram encontrados Rambozzi et al. (22), Coelho et al. (25) e Ferreira et al. (26), sugerindo-se que ambos os sexos são igualmente susceptíveis ao protozoário.

Não foi verificada diferença significativa entre a presença de oocistos nas fezes de animais com raça definida (CRD) e sem raça definida (SRD) (Tab. 1), indicando susceptibilidade a *Cryptosporidium* spp. independente da raça, como verificado por Rambozzi et al. (22) e Coelho et al. (25).

Em relação ao tipo de alimentação recebida pelos animais, também não se observou associação significativa com a frequência de *Cryptosporidium* spp. nos felinos (Tab. 2), concordando com Sotelo et al. (27) em estudo realizado com cães, embora Moura et al. (28) relatem que dietas caseiras sejam mais suscetíveis à contaminação ambiental. Convém ressaltar que nenhum dos felinos pesquisados recebia alimentação exclusivamente caseira.

Não foi observada associação significativa entre a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e o ECC dos felinos estando 16,1% (n=5) com ECC ideal (Tab. 2).

A análise estatística não revelou associação significativa entre o parasitismo por *Cryptosporidium* spp. e o uso de serviços médicos veterinários. Dos gatos positivos 7,1% (n=1) recebiam assistência veterinária (Tab. 2).

Não houve diferença significativa entre a presença de diarreia e a positividade para *Cryptosporidium* spp. (Tab. 3), resultado semelhante aos registrados por Ferreira et al. (26) e Alves et al. (29), em estudo realizado com cães. No entanto, discordando dos resultados ora obtidos, Rambozzi et al. (22) detectaram associação significativa entre a infecção por *Cryptosporidium* spp. e a ocorrência de diarreia em gatos.

Não foi também detectada associação significativa entre a positividade para *Cryptosporidium* spp. e a prática da realização do exame de fezes dos animais, observando-se o mesmo em se tratando da vermifugação (Tab. 3). Já em relação à vacinação, houve associação significativa (p=0,005) (Tab. 3), verificando-se que 29,4% (5/17) dos animais vacinados foram positivos para *Cryptosporidium* spp., enquanto 70,6% (12/17) foram negativos. Estes resultados podem ser explicados pela melhor condição imunológica desenvolvida por animais vacinados. A análise estatística não revelou associação significativa para o tipo de ambiente de criação dos felinos, assim como para a prática ou não da coleta das fezes dos animais (Tab. 4), mesmo sendo a higiene do ambiente um fator importante na epidemiologia de parasitoses (30,31).

Ressalta-se que 100% dos animais positivos não apresentavam diarreia (Tab. 4). Animais domésticos assintomáticos podem atuar como fontes de infecção de *Cryptosporidium* spp., albergando-o em seu trato intestinal e veiculando oocistos viáveis ao ambiente por meio de suas fezes (32,33), favorecendo a transmissão de forma direta ou indireta. Outro fator importante é que o número de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente aumenta à medida que cresce a densidade populacional de animais por residência (34). Por esta razão o

conhecimento sobre a criptosporidiose e seus aspectos epidemiológicos, tornam-se essenciais sob o ponto de vista da saúde pública, havendo a necessidade da ampliação de estudos abrangendo a tríade criptosporidiose - população humana - animais de companhia.

No convívio dos gatos analisados com outros animais (Tab.4), apesar de ter havido associação significativa ($p=0,015$), o percentual de gatos positivos para *Cryptosporidium* spp. que mantinha contato com outras espécies de animais domésticos foi menor (10,7%). Este dado pode remeter, dentre outros fatores, ao número amostral utilizado, já que, comprovadamente, o convívio com outros animais ou de vários animais em um mesmo espaço físico favorece a disseminação de *Cryptosporidium* spp. caso haja animais positivos para o protozoário nessa população. O contato com cães ou animais de outras espécies tem sido considerado um potencial fator de risco para a criptosporidiose (35). Já em relação ao convívio especificamente com cães (Tab.4), não houve associação significativa (Tab. 4), divergindo do constatado em estudo conduzido por Ederli et al. (36).

CONCLUSÃO

Nas condições em que se realizou o estudo, comprova-se a existência de animais positivos para *Cryptosporidium* spp. com frequência considerável nos felinos de companhia estudados, associada principalmente com a não prática da vacinação e a convivência com outros animais.

A metodologia utilizada no presente estudo baseou-se nas normas éticas de pesquisa científica com animais, aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRPE) sob a licença nº 005/2013 em 22 de fevereiro de 2013.

REFERÊNCIAS

1. Dohoo IR, Mcdonell WN, Rhodes CS, Elazhar YL. Veterinary research and human health. Can Vet J. 1998;39(9):548-56.
2. Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. Int J Parasitol. 1999;29(8):1269-87.
3. Iseki, M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. Jpn J Parasitol. 1979;28:285-307.
4. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int J Parasitol. 2000;30(12-13):1305-22.
5. Hinrichsen SL. Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.358-364.
6. Miller J. The domestic cat: perspective on the nature and diversity of cats. J Am Vet Med Assoc. 1996;208(4):498-502.
7. Huber F, Bomfim TCB, Gomes RS. Comparação entre infecção por *Cryptosporidium* sp. e por *Giardia* sp. em gatos sob dois sistemas de criação. Rev Bras Parasitol Vet. 2002;11(1):7-12.
8. Bennett M, Baxby D, Blundell N, Gaskell CJ, Hart CA, Kelly DF. Cryptosporidiosis in the domestic cat. Vet Rec. 1985;116(3):73-4.

9. Mtambo MMA, Nash AS, Blewett DA, Smith HV, Wright S. *Cryptosporidium* infection in cats: prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area. *Vet Rec.* 1991;129(23):502-4.
10. Spain CV, Scarlett JM, Wade SE, Mcdonough P. Prevalence of enteric zoonotic agents in cats less than 1 year old in central New York State. *J Vet Intern Med.* 2001;15(1):33-8.
11. Fayer R, Speer CA, Dubey JP. The general Biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer R. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Washington: CRC Press; 1997. p.1-60.
12. Morgan UM, Xiao L, Monis P, Fall A, Irwin PJ, Fayer R, et al. *Cryptosporidium* spp. in domestic dogs: the “Dog” genotype. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(5):2220-3.
13. Miller DL, Liggett A, Radi ZA, Branch LO. Gastrointestinal cryptosporidiosis in a puppy. *Vet Parasitol.* 2003;115(3):199-204.
14. Reis JC. Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária. 1a ed. Olinda: Luci Artes Gráficas; 2003.
15. Laflamme D. Development and validation of a body condition score system for cats: a clinical tool. *Feline Practice.* 1997;25(5-6):13-7.
16. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bull US Army Med Dep.* 1948;8:3-6.
17. David H, Frebault VL, Thorel MF. Méthodes de laboratoire pour mycobacteriologie clinique. Paris: Institut Pasteur;1989.
18. Ministério da Saúde. Infecções oportunistas por parasitas em AIDS: técnicas de diagnóstico. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 1996.
19. Henriksen SA, Pohlenz JFL. Staining of *Cryptosporidium* by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand.* 1981;22(3-4):594-6.
20. Arai H, Fukuda Y, Hara T, Funakosgi Y, Kanebo S, Yoshida T, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* infection among domestic cats in Tokyo metropolitan district, Japan. *Jpn J Medical Sci Biol.* 1990;43(1):7-14.
21. Nash AS, Mtambo MMA, Gibbs HA. *Cryptosporidium* infection in farm cats in the Glasgow area. *Vet Rec.* 1993;133(23):576-7.
22. Rambozzi L, Menzano A, Mannelli A, Romano S, Isaia MC. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in cats in Turin and analysis of risk factors. *J Feline Med Surg.* 2007;9(5):392-6.
23. Gennari SM, Kasai N, Pena HFJ, Cortez A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1999;36(2):87-91.
24. Ragozo AMA, Silva JCR, Caravieri R, Amajoner VR, Magnabosco C, Gennari SM. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em fezes de gatos das cidades de São Paulo e Guarulhos. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2002;39(5):244-6.

25. Coelho WMD, Amarante AFT, Soutello RVG, Meireles MV, Bresciani KDS. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras fecais de felinos do município de Andradina, São Paulo. Rev Bras Parasitol Vet. 2009;18(2):46-9.
26. Ferreira AP, Horta MAP, Pereira CRA. Análise da prevalência de *Cryptosporidium* spp. em animais de companhia de idosos. Estudo de caso: Teresópolis, Rio de Janeiro, Brasil. Rev Baiana Saude Publica. 2012;36(2):328-42.
27. Sotelo PH, Chávez VA, Casas AE, Pinedo VR, Falcón PN. Giardiasis y criptosporidiasis en caninos de los distritos del Cono Oeste de Lima Metropolitana. Rev Investig Vet Peru. 2013;24(3):353-9.
28. Moura AB, Teixeira EB, Souza AP, Sartor AA, Bellato V, Stalliviere FM. *Cryptosporidium* spp. em cães domiciliados da cidade de Lages, SC. Rev Cienc Agroveter. 2009;8(2):173-8.
29. Alves OF, Gomes AG, Silva AC. Ocorrência de enteroparasitas em cães do Município de Goiânia, Goiás: comparação de técnicas de diagnóstico. Cienc Anim Bras. 2005;6(2):127-33.
30. Matos AS, Murai HC. Prevalência de parasitoses intestinais por helmintos e protozoários em idosos. Rev Enferm UNISA. 2005;6:9-14.
31. Soares B, Cantos GA. Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Rev Bras Epidemiol. 2005;8(4):377-84.
32. Tzipori S. Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol Rev. 1983;47(1):84-96.
33. Teunis PFM, Havelaar AH. Risk assessment for protozoan parasites. Int Biodeterior Biodegrad. 2002;50(3-4):185-193.
34. Pereira CRA, Ferreira AP. Ocorrência e fatores de risco da criptosporidiose em felinos de companhia de idosos. Rev Bras Geriatr Gerontol. 2012;15(4):681-91.
35. Molbak K, Aaby P, Hojlyng N, Da Silva AP. Risk factors for *Cryptosporidium* diarrhea in early childhood: a case-control study from Guinea-Bissau, West Africa. Am J Epidemiol. 1994;139(7):734-40.
36. Ederli BB, Rodrigues MF, Carvalho CB. Fatores de risco associados à infecção por *Cryptosporidium* spp. em cães domiciliados na cidade de Campo dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet. 2008;17(1):250-66.

Recebido em: 20/01/2015

Aceito em: 24/04/2015

PERFIL BIOQUÍMICO, HORMONAL E MINERAL DE VACAS NO MOMENTO DO PARTO NORMAL E COM DISTOCIA*

Alonso Pereira Silva Filho¹
José Augusto Bastos Afonso²
Cleyton Charles Dantas Carvalho³
Janaina Azevedo Guimarães²
Nivaldo Azevêdo Costa²
Carla Lopes Mendonça²

RESUMO

Diante da grande importância da distocia para a bovinocultura, por representar elevadas perdas econômicas e mostrar a fragilidade do sistema de criação, objetivou-se estudar alguns indicadores bioquímicos no momento do parto eutócico e laborioso em vacas atendidas na rotina hospitalar. Para isso realizaram-se avaliações protéica (proteína e albumina), enzimática (creatina-quinase), hormonal (cortisol), energético (ácido graxo não esterificado e betahidroxibutirato) e mineral (cálcio, fósforo e magnésio) no soro desses animais, que tinham idade variando entre dois e 12 anos. As vacas eram oriundas de propriedades do Agreste Meridional do estado de Pernambuco, localizado no Nordeste do Brasil e atendidas na Clínica de Bovinos de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CBG/UFRPE). As vacas foram divididas em quatro grupos: grupo I (G1) distocia materna (n=79), grupo II (G2) distocia fetal (n=82), grupo III (G3) distocia materno-fetal (n=15) e grupo IV (G4) parto normal (n=13). Os valores obtidos foram analisados entre os quatro grupos, comparando-os entre si, os quais foram submetidos à análise de variância ($P < 0,05$). Na análise laboratorial dos grupos (I, II, III e IV), constataram-se, respectivamente, níveis elevados de cortisol (145,7ng/mL; 210,4ng/mL; 145,35ng/mL e 85,96ng/mL), creatinoquinase (194mg/dL; 607mg/dL; 485mg/dL e 145,7mg/dL) e NEFA (0,95mmol/L; 0,85mmol/L; 0,90mmol/L e 1,06mmol/L), além de uma hipocalcemia sub-clínica, se destacando as vacas com distocia materna, cujos valores foram (7,3mg/L; 7,8mg/L; 7,43mg/L e 8,24mg/L) respectivamente. Com isso é importante ressaltar os cuidados que se devem ter com relação ao manejo alimentar no terço final de gestação com o intuito de minimizar os efeitos negativos das deficiências nutricionais, facilitando a adaptação da vaca neste período de transição.

Palavras-chave: cortisol, cálcio, proteína, NEFA, betahidroxibutirato.

BIOCHEMICAL PROFILE, HORMONE AND MINERAL OF COWS AT THE TIME OF ELIVERY AND NORMAL WITH DYSTOCIA

ABSTRACT

Given the great importance of dystocia for cattle, which represent high economic losses and it shows the fragility of creation, aimed to study some biochemical indicators at the time of normal delivery and laborious in cows treated in hospital routine. For this evaluations were performed, protein (protein and albumin), enzyme (creatinine kinase), hormonal (cortisol),

* Apoio financeiro da Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

¹ Doutorando do programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Contato principal para correspondência.

² Clínica de Bovinos de Garanhuns, Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

³ Mestrando do programa de Pós-Graduação em ciência Veterinária da Universidade Federal.

energy (unesterified fatty acid and beta hydroxybutyrate) and mineral (calcium, phosphorus and magnesium) in the serum of these animals, which had aged between two and 12 years. The cows were from Southern Properties Agreste of Pernambuco, located in northeastern Brazil and Attended the Clinic for Cattle Garanhuns Federal Rural University of Pernambuco (CBG/UFRPE). The cows were divided into four groups: group I (G1) maternal dystocia (n = 79), group II (G2) fetal dystocia (n = 82), group III (G3) maternal-fetal (n = 15) and dystocia group IV (G4) vaginal delivery (n = 13). Data were analyzed among the four groups, comparing them to each other, which were subjected to analysis of variance (P <0.05). In laboratory test groups (I, II, III and IV) is found, respectively, high cortisol levels (145.7 ng / mL, 210.4 ng / ml, 145.35 ng / ml and 85.96 ng / ml) , creatine kinase (194mg/dL, 607mg/dL, 485mg/dL and 145.7 mg / dL), and NEFA (0.95 mmol / l 0.85 mmol / l 0.90 mmol / l and 1.06 mmol / L), and a subclinical hypocalcemia, highlighting maternal cows with dystocia, whose values were (7.3 mg / L, 7.8 mg / L, 7.43 mg / L and 8.24 mg / L) respectively. Thus it is important to emphasize the care that must be taken regarding the feeding in the final third of gestation in order to minimize the negative effects of nutritional deficiencies, facilitating the adjustment of the cow during this transition period.

Keywords: cortisol, calcium, protein, NEFA, beta hidroxibutirato.

PERFIL BIOQUÍMICO, HORMONAL Y MINERALES DE VACAS EN EL MOMENTO DEL PARTO NORMAL Y CON DISTOCIA

RESUMEN

Dada la gran importancia de la distocia del ganado, que representan grandes pérdidas económicas y que muestra la fragilidad de la creación, este trabajo tuvo como objetivo estudiar algunos indicadores bioquímicos en las vacas en el momento del parto normal y laborioso en las vacas tratadas en la rutina del hospital. Por estas evaluaciones de laboratorio se realizaron, proteína (proteína y albúmina), enzima (creatina quinasa), hormonales (cortisol), energía (ácido graso no esterificado y betahidroxibutirato) y minerales (calcio, fósforo y magnesio) en el suero de estos animales, que tenía con edades comprendidas entre dos y 12 años. Las vacas eran de Propiedades del Sur Agreste de Pernambuco, ubicado en el noreste de Brasil y asistió a la Clínica de Bovinos en Garanhuns de la Universidad Federal Rural de Pernambuco (CBG/UFRPE). Las vacas se dividieron en cuatro grupos: grupo I (G1) distocia materna (n = 79), grupo II (G2) distocia fetal (n = 82), el grupo III (G3) materno-fetal (n = 15) y grupo de distocia IV (G4) parto vaginal (n = 13). Se analizaron los datos entre los cuatro grupos, comparándolos entre sí, que se sometieron a análisis de varianza (p <0,05). En los grupos de ensayo de laboratorio (I, II, III y IV) se encuentra, respectivamente, los niveles altos de cortisol (145,7 ng / ml, 210,4 ng / ml, 145,35 ng / ml y 85,96 ng / ml) , creatina quinasa (194mg/dL, 607mg/dL, 485mg/dL y 145,7 mg / dl), y NEFA (0,95 mmoles / l 0,85 mmoles / l 0,90 mmoles / l y 1,06 mmol / l), y una hipocalcemia subclínica, destacando las vacas madres con distocia, cuyos valores fueron (7,3 mg / L, 7,8 mg / L, 7,43 mg / ly 8,24 mg / L), respectivamente. Por lo tanto, es importante tener cuidado con respecto a la alimentación en el tercio final de la gestación con el fin de minimizar los efectos negativos de las deficiencias nutricionales, facilitar el ajuste de la vaca durante este período de transición.

Palabras clave: cortisol, calcio, proteína, NEFA, betahidroxibutirato.

INTRODUÇÃO

A qualificação genética das raças tem melhorado cada vez mais a produtividade dos rebanhos, no entanto, esse aumento da produção vem acompanhado pelo aparecimento de distúrbios metabólicos, sendo necessárias melhores condições de manejo e alimentação durante o período de transição. Como as doenças infecciosas são mais efetivamente controladas por um programa de imunização e procedimentos de isolamento, os problemas metabólicos constituem as principais enfermidades dos bovinos leiteiros, principalmente no momento da concepção onde a vaca passa por essas alterações e podem apresentar dificuldades no desencadeamento do parto (1, 2).

Rebanhos de alta produção mostram que uma em cada duas a três vacas sofre algum tipo de injúria sanitária e/ou nutricional durante o período de transição, o que mostra a fragilidade do sistema de criação (3). Desta forma, esses problemas demonstram a necessidade de melhorias no manejo, para que as vacas possam atingir o seu potencial genético de produção de leite sem prejuízo a sua saúde e a rentabilidade da atividade leiteira. Contudo, o conhecimento das alterações fisiológicas e metabólicas, que ocorrem neste período, é extremamente importante para que se possam minimizar as grandes perdas econômicas (4). Atualmente, o perfil metabólico ganhou importância e vem sendo utilizado, especialmente, relacionando às enfermidades de vacas leiteiras no período de transição como ferramenta para o diagnóstico, prognóstico e prevenção (5-8).

Trabalhos mostram que vacas com baixo escore corporal no momento do parto são mais acometidas por enfermidades reprodutivas. As deficiências minerais, hormonais e vitamínicas são as principais causas no aparecimento destes problemas. Essas carências resultam em contrações uterinas insuficientes, podendo apresentar distocias no momento do parto, além de não conseguirem eliminar totalmente os restos placentários. Este quadro pode desenvolver enfermidades comprometendo a sanidade do animal e, conseqüentemente, a produção de leite (4).

O principal fator que colabora para o desenvolvimento dessas enfermidades é o balanço energético negativo (BEN) que o animal desenvolve em virtude da queda na ingestão de matéria seca no mesmo período em que ocorre uma demanda abrupta e substancial no requerimento de nutrientes para desenvolvimento fetal e produção de leite. Este momento de BEN tem sido associado com imunossupressão, doenças do peri-parto, aumento do tempo para primeira ovulação e cobertura (9).

Diante da importância da bovinocultura e da alta ocorrência de distúrbios reprodutivos, além da carência de informações relacionadas a estes problemas na região da bacia leiteira do estado de Pernambuco, objetivou-se estudar alguns elementos bioquímicos, hormonal e mineral no momento do parto associado à ocorrência de distocias de origem materna e/ou fetal em vacas atendidas na rotina hospitalar.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados e local do experimento

Realizaram-se avaliações laboratoriais no soro de 189 vacas com distocias (materno e/ou fetal) e de partos normais com idade variando entre dois e 12 anos, coletado no momento do parto. Oriundas de propriedades do Agreste Meridional do estado de Pernambuco, localizado no Nordeste do Brasil e atendidas na Clínica de Bovinos de Garanhuns, Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CBG/UFRPE). Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo I (G1) distocia de origem materna (DOM), grupo II (G2) distocia de

origem fetal (DOF), grupo III (G3) distocia de origem materno-fetal (DOMF) e grupo IV (G4) parto normal (PN).

Coleta de material e Análise

Para as análises dos dados, coletaram-se amostras de sangue em tubos siliconizados vacutainer® (sem anticoagulante), utilizando-se agulhas 25x8mm, mediante punção da veia jugular. Posteriormente, foram centrifugadas por um período de cinco minutos a 3.500 rpm. As alíquotas de soro foram acondicionadas em tubos tipo *eppendorf* e armazenadas em freezer à -80°C para posterior processamento laboratorial.

O conjunto de variáveis estudadas no soro foi: Hormonal (cortisol – n=96), pelo método eletroquimioluminescência³; Proteico (albumina n=189, proteína total n=189); Enzimático (Creatinoquinase n=186) e Mineral (cálcio total n=185, fósforo n=188 e magnésio n=188), determinado quantitativamente pelo método colorimétrico; e Energético (betahidroxibutirato n=98, ácido graxos não esterificados/NEFA n=94) por meio da metodologia enzimática, em todas estas análises utilizaram-se kits comerciais (LABTEST)⁴, além de corpo cetônico (betahidroxibutirato) que foi realizado pelo método cinético UV – D-3-Hydroxybutyrate (RANBUT) RANDOX⁵. As avaliações bioquímicas foram processadas em analisador bioquímico semi-automático Labquest.

Análise estatística

Os valores obtidos foram analisados entre os quatro grupos, comparando-os entre si, os quais foram submetidos à análise de variância. As estatísticas F calculadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, sendo que os contrastes entre as médias foram realizados pelo método de Tukey, calculando-se a diferença mínima significativa (dms) para alfa igual a 0,05. Para a análise das variáveis consideradas não paramétricas, foi empregado o teste de Kruskal-Wallis, usando o χ^2 e calculando a dms para alfa igual a 0,05 empregando-se o programa computacional Sigma Stat (10).

RESULTADOS

Avaliando os dados epidemiológicos constatou-se, nas vacas atendidas, uma ocorrência maior de DOF 46,6% nas vacas analisadas, seguida das DOM acometendo 44,9% e 8,5% DOMF.

Análise Laboratorial

Os níveis de proteína total das vacas avaliadas encontraram-se dentro dos parâmetros de normalidade para espécie, todavia, a albumina apresentou-se pouco abaixo do limite inferior. Entretanto não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os grupos, conforme (Tabela 1).

Com relação ao cortisol, todos os grupos estudados apresentaram valores bem elevados no momento do parto, porém resultados mais expressivos foram constatados nos animais com distocias, nos quais se destaca os pertencentes ao G2, cujos valores foram mais elevados, havendo diferença significativa ($P < 0,05$) com as vacas que compõem os grupos G1 e G4. Os níveis de creatinoquinase (CK), também se mostraram elevados nos grupos avaliados, porém nos casos de distocias apresentaram valores médios maiores do que as de parto normal,

⁴ LABTEST DIAGNÓSTICICA

⁵ Kit comercial da RANDOX Laboratories Ltd.

entretanto não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre os quatro grupos (Tabela 1).

Analisando o perfil energético destes animais, observou-se que os valores de β -hidroxibutirato (BHB) dos grupos estudados não apresentaram alterações e não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre os grupos. Contudo, os níveis de NEFA, em todos os grupos apresentaram-se elevados, não observando diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre eles (Tabela 1).

Na avaliação mineral, mereceu destaque os valores de cálcio total sérico abaixo do limite em todos os grupos analisados, mais expressivos nos casos de distocia materna (G1), apresentando diferença estatística significativa ($P<0,05$) entre as vacas dos grupos G2 e G4. Na avaliação dos níveis de fósforos, todos os grupos apresentaram valores pouco abaixo do limite inferior de normalidade para a espécie, sendo mais expressivo no grupo (G1), entretanto, não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$). Com relação aos níveis de magnésio observaram-se os valores um pouco acima do limite superior de normalidade, contudo não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre os grupos estudados (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação bioquímica de vacas com distocia materna, fetal, materno/fetal e de parto normal, no momento do parto.

Variáveis analisadas	Valor bioquímico médio, desvios padrão (x \pm s) e mediana das vacas avaliadas no momento do parto com:				*Referência
	(DOM) Distocia Materna (G1)	(DOF) Distocia Fetal (G2)	(DOMF) Distocia Materno/fetal (G3)	(PN) Parto Normal (G4)	
Proteína total (g/dl)	(n=79) 7,72 (25-75%) ^a	(n=82) 7,53 (25-75%) ^a	(n=15) 8,05 (25-75%) ^a	(n=13) 7,58 (25-75%) ^a	6,74 – 7,46
Albumina (g/dl)	(n=79) 2,77 (25-75%) ^a	(n=82) 2,94 (25-75%) ^a	(n=15) 2,68 (25-75%) ^a	(n=13) 3,00 (25-75%) ^a	3,03 – 3,55
Cortisol (ng/mL)	(n=51) 145,7 (25-75%) ^a	(n=34) 210,4 (25-75%) ^b	(n=6) 145,35 (25-75%) ^{ab}	(n=6) 80,96 (25-75%) ^a	15 – 19
BHB ¹ (mmol/L)	(n=47) 0,35 (25-75%) ^a	(n=40) 0,40 (25-75%) ^a	(n=6) 0,43 (25-75%) ^a	(n=6) 0,57 (25-75%) ^a	0 – 0,7
NEFA ² (mmol/L)	(n=48) 0,95 \pm 0,495 ^a	(n=35) 0,85 \pm 0,418 ^a	(n=6) 0,90 \pm 0,481 ^a	(n=6) 1,06 \pm 0,455 ^a	< 0,4
CK ³ (mg/dL)	(n=78) 194 (25-75%) ^a	(n=82) 607 (25-75%) ^a	(n=15) 485 (25-75%) ^a	(n=12) 145,7 (25-75%) ^a	4,8 – 12,1
Cálcio total (mg/dL)	(n=77) 7,3 (25-75%) ^b	(n=81) 7,8 (25-75%) ^a	(n=14) 7,43 (25-75%) ^{ab}	(n=13) 8,24 (25-75%) ^a	9,7 – 12,4
Fósforo (mg/dL)	(n=78) 4,05 (25-75%) ^a	(n=82) 4,7 (25-75%) ^a	(n=15) 5,6 (25-75%) ^a	(n=13) 4,7 (25-75%) ^a	5,6 – 6,4
Magnésio (mg/dL)	(n=78) 2,4 (25-75%) ^a	(n=82) 2,55 (25-75%) ^a	(n=15) 2,65 (25-75%) ^a	(n=13) 2,59 (25-75%) ^a	1,8 – 2,3

Letras minúsculas diferentes na mesma linha $P<0,05$

1. BHB – Beta-hidroxibutirato; 2. NEFA - Ácido graxo não esterificado; 3. CK – Creatinoquinase. * Fonte Kaneko et al. (11).

DISCUSSÃO

Embora foi observada uma pequena diferença entre a ocorrência de DOM e DOF neste estudo, a literatura afirma que as distocias de origem fetal são mais comuns em vacas (12). Trabalhos realizados, no Brasil, por Costa et al. (13) relataram um maior número de casos de DOF 60,22% em vacas, do que as DOM 31,67%, já as DOMF apresentou-se em apenas 8,9% dos animais acometidos. Em outra pesquisa realizada por Borges et al. (14) com 149 vacas atendidas na rotina hospitalar, também destacou as DOF. Neste estudo, somando-se as distocias que envolvem problemas maternos (DOM e DOMF), atinge mais de 50% dos casos de partos laboriosos atendidos na rotina hospitalar da CBG/UFRPE. Este acontecimento pode está associado à característica produtiva dos animais, pois se tratam de vacas leiteiras e a demanda por nutrientes neste período é muito grande, aumentando a possibilidade de distúrbios metabólicos que comprometem o desencadeamento do parto.

Proteína

Apesar dos níveis proteicos dos animais avaliados apresentarem-se dentro dos limites de normalidade, segundo Fleming (15), durante o pré-parto, ocorre uma diminuição na ingestão de matéria seca em 28% nos 17 dias que antecedem o parto normal, redução maior, da ordem de 40%, foi verificada dois dias antes da parição. Contudo durante o período de transição a vaca mobiliza suas reservas para atender suas demandas, no entanto animais que apresentam problemas no momento do parto, tanto a ingestão quanto a mobilização de suas reservas podem ser prejudicadas, isso pode justificar os níveis pouco abaixo do limite inferior da albumina desses animais. Segundo Gonzáles et al., (16) uma queda acentuada no nível desta proteína poderia causar, conseqüentemente uma diminuição do valor de cálcio sérico no sangue.

Cortisol

Os níveis elevados deste hormônio, encontrado neste estudo, corroboram com os achados descritos por Gala & Westphal (17); Enrighth et al. (18) e Nikolic et al. (19) onde relatam que em geral, os valores de glicocorticóides no sangue permanecem baixos na maior parte da gestação, porém apresentam valores mais expressivos que coincide com o momento do parto, em função do estresse que ocorre neste período. Entretanto, segundo Sorge, (20) e Burton et al. (21) perturbações ambientais nessa fase podem está associada à presença contínua de pessoas e piquete superlotado, comprometendo a viabilidade fetal, pois pode levar à redução da motilidade uterina, dilatação cervical insuficiente e diminuição das contrações abdominais resultando em um parto prolongado e/ou distócico. Rushen (22) e Beerda et al. (23) acrescentam que o cortisol tem sido considerado um bom indicador de estresse.

Enzima

Acredita-se que a elevação do nível de CK observado neste estudo esteja relacionada às tentativas de manobras obstétricas improdutivas, que retardam ou prolongam o atendimento mais efetivo, provocando lesões musculares e retardando a recuperação da parturiente. Conforme Morais et al. (27) esta é a enzima mais sensível para indicar lesões musculares, que ocorrem com vacas submetidas a decúbito e cansaço físico prolongado. O esforço do parto também é outro fator que contribui para o aumento dessa enzima. Estes achados sugerem ter ocorrido uma extensa lesão muscular, o que explica as manifestações deste componente muscular. A maioria das vacas acometidas, deste estudo, havia sido previamente manipulada na propriedade, sofrendo variados graus de intervenção antes de darem entrada na clínica, justificando os níveis tão elevados dessa enzima, principalmente dos grupos que apresentaram distocias. Alguns autores acrescentam que a principal complicação dos quadros de decúbito persistente é a isquemia da musculatura dos membros posteriores, pela pressão do peso do animal em decúbito, causando progressiva degeneração e necrose muscular, fato este que, dependendo da intensidade dessa isquemia, pode comprometer a recuperação das vacas no pós-parto (28, 29).

Energético

Na análise do BHB não foi observado nenhuma alteração. Para Oetzel (24) este é um parâmetro bioquímico de boa confiabilidade para avaliação do perfil energético devido à sua estabilidade, quando comparado com os outros corpos cetônicos, podendo ser analisado a

partir de amostras de sangue, leite ou urina. Quando encontrado em níveis elevados, refletem um quadro de déficit energético grave e risco de desenvolver cetose. Diante disso conclui-se que os animais com distocias e/ou de parto normal, não apresentaram um déficit de energia tão elevado capaz de provocar transtorno no momento do parto.

Contudo, os níveis de NEFA de todos os grupos apresentaram-se elevados. Segundo Duffield (25) sua determinação é uma importante ferramenta na previsão da mobilização das reservas corporais, pois permite a detecção precoce de vacas com risco para o desenvolvimento de enfermidades relacionadas a um grave balanço energético negativo (BEN), pois concentrações muito elevadas têm sido propostas como indicadores de um excessivo BEN no pré-parto, possibilitando a tomada de uma série de medidas preventivas referente às mesmas. O início da lactação é considerado um período crítico devido ao BEN, porém, para alguns autores, não é nesse período que a concentração de NEFA se encontra elevada e sim nas últimas semanas antes do parto com pico no dia do parto (26). Esta elevação nos níveis de NEFA, acima da normalidade, pode justificar perante os fatores presente no momento do parto como a grande demanda de energia gasta para parir, a diminuição no consumo de alimento e os níveis elevados de cortisol que interferem na utilização da glicose pelo organismo, estes fatores podem estar diretamente associados a uma mobilização maior neste período.

Minerais

O cálcio total sérico foi o elemento que teve maior relação com a ocorrência de partos laboriosos e que representa um fator de risco importante, inclusive para as vacas de parto normal, onde se observou o nível sérico deste mineral abaixo do limite estabelecido para a espécie, destacando-se as vacas acometidas por DOM, em que apresentam os menores resultados. Segundo a literatura, estes achados podem refletir numa série de complicações que estão associadas à hipocalcemia, destacando o aumento na ocorrência de distocia em 7,2 vezes, nos casos em que as vacas apresentam níveis baixos de cálcio no momento do parto. Outros problemas observados também são: o prolapso de útero pode ser 3,1 vezes mais freqüente em vacas com febre do leite, além de retenção de placenta que pode aumentar em 5,7 vezes e mastite clínica, em que está 5,4 vezes mais presente, principalmente devido ao decúbito prolongado nesses animais (29).

Os níveis baixos de cálcio em todos os grupos representam um achado importante para se compreender melhor a ocorrência dos casos de distocias, principalmente nas vacas de alta produção que são submetidas a um constante desafio metabólico. Conforme Gonzáles et al. (16) o cálcio exerce um papel extremamente importante no metabolismo das vacas, pois este mineral está envolvido em uma ampla gama de funções no organismo destes animais. Goff (30) acrescenta que este mineral liga-se à troponina, a qual permite a ligação cruzada da actina e da miosina, resultando na contração muscular. O cálcio intracelular, embora seja 1/10.000 da concentração do cálcio extracelular, está envolvido em uma ampla gama de enzimas e funciona como segundo mensageiro, para retransmitir a informação do exterior da célula para o seu interior. A maior parte dos hormônios peptídicos não pode entrar na célula-alvo, onde iniciam a atividade biológica. A concentração extracelular também influencia a secreção de outras substâncias pelos nervos e glândulas endócrinas. Contudo, a vaca hipocalcêmica é incapaz de secretar insulina pelo pâncreas tornando-se hiperglicêmica. Segundo Jackson (31), a hipocalcemia ocorre especialmente na vaca, próximo da hora do parto e pode ser responsável pela inércia uterina primária nessa espécie, uma das causas das distocias de origem materna, fato este constatado em algumas situações deste trabalho.

Com relação ao fósforo, observam-se níveis um pouco abaixo do limite de normalidade em todos os grupos estudados. A concentração deste mineral no soro ou plasma é muito usada, já que seus valores caem rapidamente quando a dieta é inadequada (32). Cerca de 30%

do fósforo sanguíneo está presente como ânion fosfato inorgânico; o restante está incorporado em moléculas orgânicas, como as proteínas e as membranas celulares. No final da gestação, os níveis de fósforo plasmático podem declinar precipitadamente, à medida que o crescimento do feto se acelera e remove quantidades substanciais de fósforo da circulação materna. Estes animais freqüentemente ficam em decúbito e são incapazes de se levantar, embora pareçam razoavelmente alertas e comam o alimento colocado à sua frente. A doença em geral se complica pela hipocalcemia, hipomagnesemia e em alguns casos pela hipoglicemia concomitantes (30). Nos casos mais comuns de uma deficiência de fósforo observa-se um escore corporal ruim, com emagrecimento e fraqueza generalizada, fraturas, diminuição da secreção dos hormônios hipotalâmico-hipofisários, podendo desencadear problemas no momento do parto (34), contudo os níveis pouco abaixo do limiar de normalidade observado nos quatro grupos estudados não foram suficientes para provocar tais achados clínicos supracitados pela literatura.

Os níveis de magnésio, um pouco acima da normalidade, observados nessa pesquisa, pode representar um fator de risco importante, onde este achado associado a concentrações baixas de cálcio, que também foram observadas nesse estudo, pode desencadear complicações para o animal no momento do parto. Pois para alguns autores o magnésio inibe competitivamente a entrada do cálcio no neurônio motor. A vaca que estiver hipocalcêmica e hipermagnesêmico só será capaz de iniciar contrações musculares muito fracas. Esta condição é conhecida como paresia, frequentemente observado em vacas leiteiras (31, 27).

CONCLUSÃO

Diante dos resultados, pode-se avaliar que a origem de um balanço energético negativo associado ao desequilíbrio de alguns elementos minerais, destacando-se o cálcio, contribui para ocorrência de transtorno de natureza obstétrica, acarretando inclusive em perdas econômicas significativas, comprometendo, sobretudo, a vida da parturiente e seu produto.

REFERÊNCIA

1. Guard C. Doenças metabólicas: uma abordagem de rebanho, In: Rebhun WC, Guard C, Richards CM, editores. Doenças do gado leiteiro. São Paulo: Editora Roca; 2000. p. 613-6.
2. Silva LAF, Vieira MCM, Fioravanti MCS, Eurides D, Borges NC. Avaliação das complicações e da performance reprodutiva subsequente à operação cesariana realizada a campo em bovinos. Ciênc Anim Bras. 2000;1:43-51.
3. Duffield T, Bagg R, Descoteaux L, Bouchard E, Brodeur M, Dutremblay D, et al. Prepartum monensin for the reduction of energy associated disease in postpartum dairy cows. J Dairy Sci. 2002;85:397-405.
4. Rabelo E, Campos BG. Fisiologia do período de transição [Internet]. [cited 2012 Jan 15]. Available from: www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewFile/7921/5782.
5. Mcguire MA, Theurer M, Vicini JL, Crooker B. Controlling energy balance in early lactation. Adv Dairy Technol. 2004;16:241-52.
6. Duffild TF, Lissemore KD, McBride BW, Leslie KE. Impacto f hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. J Dairy Sci. 2009;92:571-80.
7. Dubuc J, Duffild TF, Leslie KE, Walten JS, Leblanc SJ. Risk factors for postpartum uterine dieases in dairy cows. J Dairy Sci. 2010;93:5764-71.

8. Chapinal N, Carson M, Duffield TF, Capel M, Godden S, Overton M, et al. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J Dairy Sci.* 2011;94:4897-903.
9. Roberts T, Chapinal N, Leblanc SJ, Kelton DF, Dubuc J, Duffield TF. Metabolic parameters in transition cows as indicators for early lactation culling risk. *J Dairy Sci.* 2012;95:3057-63.
10. Curi PR. Metodologia e análise da pesquisa em Ciências Biológicas. Botucatu: Tipomic; 1997. 263p.
11. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Clinical biochemistry of domestic animals. 6th ed. San Diego: Academic Press; 2008. 916p.
12. Singla VK, Gandotra VK, Prabhakar SE, Sharma RD. Incidence of various types of dystocias e cows. *Indian Vet J.* 1990;67:283-4.
13. Costa NA, Afonso JAB, Souza MI, Mendonça CL, Tokarnia CH, Pereira ALL, et al. Ocorrência de cesarianas na clínica de bovinos de Garanhuns-PE/UFRPE, no período de 1988 a 2001. In: Anais do XI Congresso Latinoamericano de Buiatria e III Congresso Nordeste de Buiatria; 2003; Salvador, Bahia. Santo Amaro (BA): Associação Baiana de Buiatria; 2003. p. 41.
14. Borges MCB, Costa JN, Ferreira MM, Menezes RV, Chalhoub M. Caracterização das distocias atendidas no período de 1985 a 2003 na Clínica de Bovinos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. *Rev Bras Saúde Prod Anim.* 2006;7:87-93.
15. Fleming SA. Distúrbios metabólicos. In: Smith BP. Medicina interna de grandes animais. 3a ed. São Paulo: Manole; 2006. Cap 39, p. 1241-65.
16. Gonzáles FHD, Barcellos JO, Ospina H, Ribeiro LAO, editores. Perfil metabólico em Ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais [Internet]. Porto Alegre: Editado pelos Autores; 2000 [cited 2009 Mar 20]. Available from: <http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/perfil%20nutricional%20ruminantes.pdf>
17. Gala RR, Westphal U. Corticosterone-binding globulin in the rat: possible role in the initiation of lactation. *Endocrinology.* 1965;76:1079-88.
18. Enright WJLT, Chapin WM, Moseley SA, Zinn SA, Tucker HÁ. Growth hormone releasing factor stimulates milk production and sustains growth hormone release in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 1986;69:344-51.
19. Nikolic JA, Kulcsar M, Kátai L, Nedic O, Jánosi S, Huszenicza G. Periparturient endocrine and metabolic changes in healthy cows and in cows affected by mastitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2003;50:22-9.
20. Sorge U. The effect of varied duration of the close up period of primiparous cows on the incidence of dystocia and perinatal calf mortality [PhD Dissertation]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2005. 110p.

21. Burton JL, Weber PSD, Bush AA, Neuder L, Raphael W, Erskine RJ, et al. Parturient steroids and labor duration associate with dystocia and stillbirth. *J Dairy Sci.* 2006; Suppl 1:8.
22. Rushen J. Some issues in the interpretation of behavioral responses to stress. In: Moberg GP, Mench JA, editors. *The biology of animal stress.* Wallingford: CAB International; 2000. p. 23-42.
23. Beerda B, Kornalijnslijper JE, Van Der Werf JTN, Noordhuizen-Stassen EN, Hopster H. Effects of milk production capacity and metabolic status on HPA function in early postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 2004;87:2094-102.
24. Oetzel GR. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Vet Clin North Am Food Anim.* 2004;20:651-74.
25. Duffield T. Monitoring strategies for metabolic disease in transition dairy cows. In: *Proceedings of 23rd World Buiatrics Congress; 2004 Jul 11-16; Québec, Canada [Internet]. Québec: World Association for Buiatrics; 2004 [cited 2015 Jan 12]. Available from:*<http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2004/toc.asp>.
26. Grummer RR. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet J.* 2008;176:10-20.
27. Morais MG, Rangel JM, Madureira JS, Silveira AC. Variação sazonal da bioquímica de vacas aneloradas sob pastejo contínuos de *Brachiaria decubens*. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2000;52:98-104.
28. Rodrigues R, Gonzalés FHD. Distúrbios do metabolismo do cálcio: hipocalcemia puerperal e eclampsia [Internet]. Porto Alegre: Programa de PósGraduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004 [cited 2009 Fev 12]. Seminário apresentado na disciplina bioquímica do tecido animal. Available from: http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/TMAD/disturbios_calcio.pdf.
29. Garcia M. Outras doenças: Síndrome da vaca caída (Decúbito persistente). In: Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RAA, Borges JRJ. *Doenças de ruminantes e eqüídeos.* 3a ed. Santa Maria: Palloti; 2007. v. 2, cap. 10, p. 673-4.
30. Goff JP. Digestão, absorção e metabolismo – minerais. In: Reece WO. *Dukues: Fisiologia dos animais domésticos.* 12a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. cap. 35, p. 532.
31. Jackson PGG. Distocia na vaca. In: *Obstetrícia veterinária.* 2a ed. São Paulo: Editora Roca; 2005. p. 47-104.
32. Nicodemos MLF, Moraes SS, Rosa IV, Macedo MCM, Thiago LRLS, Anjos CR. Uso de parâmetros ósseos, plasmáticos e fecais na determinação da deficiência de fósforo em bovinos. *Rev Bras Zootec.* 2000;29:840-7.

33. Grunet E, Birge HE, Vale GW. Efeitos do meio ambiente e a nutrição sobre a reprodução. In: Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia. São Paulo: Varela; 2005. p. 127-33.
34. Dirksen G. Sistema digestivo. In: Dirksen G, Grunder HD, Stober M. Exame clínico dos bovinos. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara – Koogan; 1993. p. 204.

Recebido em: 24/08/2012

Aceito em: 22/06/2015

PESQUISA DE ANTICORPOS E DNA DE *Leptospira* spp. EM SORO CANINO

Helio Langoni¹
Maíra Claudio de Ponte¹
Daniela Barbosa¹
Marcela de Pinho Manzi¹
Rodrigo Costa da Silva¹
Benedito Donizete Menozzi¹

RESUMO

A leptospirose é uma antropozoonose causada por diferentes sorotipos de leptospiras cuja epidemiologia está associada a altos índices pluviométricos, com alta ocorrência em animais de companhia, de interesse zootécnico e espécies silvestres. Os cães tem estreita relação com humanos e pela infecção renal podem eliminar a bactéria pela urina, sendo importante fonte de infecção. O presente estudo objetivou a determinação da soroprevalência e a carga bacteriana de *Leptospira* spp. em 151 cães de um Centro de Controle de Zoonoses. Foram coletadas amostras de sangue para a obtenção de soro e realização da prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM). 59/151 (39,1%) dos animais foram sororreagentes para pelo menos um sorovar sendo os de maior prevalência e com títulos mais elevados o sorovar *Copenhageni* (23,73%) pertencente ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* e o sorovar *Icterohaemorrhagiae* (16,95%). O sorovar *Canicola*, comumente encontrado nos cães, apresentou 10,17% de sororreatividade com títulos menores. As amostras de soro foram também submetidas a pesquisa de DNA da bactéria pela reação em cadeia pela polimerase convencional (cPCR) utilizando-se os primers Lep1 e Lep2 e apenas uma amostra foi positiva sendo submetida a PCR quantitativa (qPCR), que resultou numa carga bacteriana de 14.829.820/mL. Os resultados demonstram evidência de infecção por *Leptospira* spp. em cães, com níveis de anticorpos detectáveis à SAM, e que em um cão foi possível detectar a bactéria no soro sanguíneo. Destaca-se, portanto, a dispersão de diferentes sorovares de *Leptospira* spp. no ambiente, devido à eliminação destes sorovares por animais portadores renais, bem como o risco de transmissão para outros animais e humanos e a importância dos cães como animais sentinelas nos estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: leptospira, cães, anticorpos, DNA bacteriano.

ANTIBODIES AND DNA DETECTION OF *Leptospira* spp. IN CANINE SERUM**ABSTRACT**

Leptospirosis is a anthropozoonosis caused by different serotypes of leptospira whose epidemiology is associated with heavy rainfall, with high occurrence in pets, animals of zotechnical interest and wild species. Dogs have close relationship with humans and in the kidney infection can eliminate the bacteria in the urine, being an important source of infection. The present study aimed to determine the prevalence of antibodies and bacterial load of *Leptospira* spp. in 151 dogs received at a Center for Zoonosis Control. Blood samples were collected to obtain serum which was submitted to the Microscopic Agglutination Test (MAT). 59/151 (39.1%) dogs were seropositive for at least one serovar with the highest prevalence and higher titers for the serovar *Copenhageni* (23.73%) serogroup

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses, DHVSP-FMVZ-UNESP – Botucatu. Contato principal para correspondência

Icterohaemorrhagiae and to serovar *Icterohaemorrhagiae* (16.95%). The Canicola serovar, commonly found in dogs, showed 10.17% of seroreactivity with smaller titles. Serum samples were also examined for the presence of DNA of the bacterium by the conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR) using the primers Lep1 and Lep2 and only one sample was positive, being subjected to quantitative PCR (qPCR), resulting in bacterial load of 14.829.820/mL. The results show evidence of infection with *Leptospira* spp. in dogs, with detectable levels of antibodies by MAT, and in one dog the bacteria could be detected in the blood serum. It is noteworthy, therefore, the environment dispersion of different serovars of *Leptospira* spp., due to the elimination of these serovars by carrier animals kidney, and the risk of transmission to other animals and humans and the importance of dogs as sentinel animals in epidemiological studies.

Keywords: leptospira, dogs, antibodies, bacterial DNA.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS Y ADN DE *Leptospira* spp. EN SUERO CANINO

RESUMEN

La leptospirosis es una antropozoonosis causada por diferentes serotipos de leptospira cuya epidemiología se asocia con alta precipitación, con una alta incidencia en los animales domésticos, de interés zootécnico y las especies silvestres. Los perros tienen una estrecha relación con los seres humanos y la infección renal puede eliminar las bacterias en la orina, una importante fuente de infección. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de anticuerpos y la carga bacteriana de *Leptospira* spp. en 151 perros recibidos en un Centro de Control de Zoonosis. Se recogieron muestras de sangre para obtener suero y la realización de la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT). 59/151 (39,1%) de los perros eran seropositivos a al menos un serovar, con mayor prevalencia y títulos mayores para el serovar *Copenhageni* (23,73%) del serogrupo *icterohaemorrhagiae* (16,95%). El serovar canicola, que se encuentra comúnmente en perros, mostró 10,17% de serorreactividad con títulos menores. También se examinaron muestras de suero para detectar la presencia de ADN de la bacteria por la reacción en cadena de la polimerasa convencional (cPCR) utilizando los cebadores LEP1 y LEP2 y sólo una muestra fue positiva, siendo sometida a PCR cuantitativa (qPCR), lo que resultó en un cargo bacteriano 14.829.820/mL. Los resultados muestran evidencia de infección con *Leptospira* spp. en perros, con niveles detectables de anticuerpos MAT y que en un perro podría detectar bacterias en el suero sanguíneo. Es de destacar, por lo tanto, la dispersión de diferentes serovares de *Leptospira* spp. para el medio ambiente, debido a la eliminación de estos serovares por animales portadores renales, así como el riesgo de transmisión a otros animales y seres humanos y la importancia de los perros como animales centinelas en los estudios epidemiológicos.

Palabras clave: leptospira, perros, anticuerpos, ADN bacteriano.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose bacteriana aguda ou crônica de grande polimorfismo clínico que afeta diversas espécies animais, entre elas os caninos, e humanos. Seu agente etiológico é a *Leptospira interrogans*, com mais de 250 sorotipos.

Os animais domésticos e silvestres podem se tornar portadores e contribuir para a disseminação das leptospirosas no ambiente. Humanos se infectam direta ou indiretamente, respectivamente, por lesões na pele e mucosas ou por meio da água, solo e alimentos contaminados com urina de animais portadores (1). Os roedores geralmente são portadores

permanentes de diversos sorovares de leptospiros, portanto, os ambientes em que circulam estão constantemente contaminados (2).

Nos cães, a infecção pode variar de quadros assintomáticos a graves. A forma mais grave é a hemorragia que se instala repentinamente com febre por 3 a 4 dias, seguida por rigidez e mialgias nos membros posteriores, hemorragia na cavidade oral com tendência a formação de úlceras, necrose e faringite. Em etapa posterior pode haver gastroenterite hemorrágica e nefrite aguda. Tanto na leptospirose pelo sorovar *Canicola* como pelo *Icterohaemorrhagiae* pode haver icterícia (3).

O caráter zoonótico da enfermidade é dado pela transmissão da bactéria para humanos, principalmente, por meio da urina de roedores e também pelo contato com cães, que adquirem a doença pelo contato com outros cães ou roedores que urinam em áreas comuns. As áreas tropicais do globo são endêmicas, devido ao alto índice pluviométrico, sendo que os maiores registros de casos de leptospirose são nas estações chuvosas; havendo um agravamento em inundações, situações em que os roedores migram para os domicílios (3,4).

No Brasil, os achados sorológicos em cães indicam a soroprevalência de diferentes sorovares, como *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni*, *Canicola*, *Pyrogenes*, *Hardjo*, *Castellonis* e *Ballum* entre outros, variando as porcentagens e importância entre os vários pesquisadores e regiões (1,4-8).

O teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) é considerado pela Organização Mundial da Saúde como o método de eleição para diagnóstico sorológico da leptospirose, apresentando alta sensibilidade e especificidade, aliado a simples execução e precocidade dos resultados (9). As ferramentas moleculares têm contribuído para a avaliação epidemiológica da condição de infecção e contaminação ambiental, auxiliando na determinação de portadores renais. A detecção do DNA pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) é altamente sensível e permite um diagnóstico acurado. Perfis de detecção direcionados para leptospiros patogênicas são estudados atualmente, porém a utilização de *primers* gênero-específicos associado com provas sorológicas e a clínica permitem uma maior confiabilidade dos resultados, melhor interpretação e atividades de vigilância com vistas ao controle da disseminação da infecção (1).

Este estudo teve como objetivo determinar a soroprevalência de anticorpos e a presença de DNA de *Leptospira* spp. pela PCR e a carga bacteriana nas amostras de soro de cães recebidos em um Centro de Controle de Zoonoses buscando-se elucidar os aspectos de epidemiologia e de patogenia na infecção leptospírica.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e obtenção de amostras

Utilizou-se o programa Epi Info (10) para se determinar o cálculo do número de amostras (n). Considerando-se uma população humana de 344.039 habitantes no município, e uma proporção da população humana em relação a canina de 1:7 (11), estimou-se a população canina aproximada de 49.000 animais, e, como a prevalência em animais errantes na região era desconhecida, utilizou-se como referência uma prevalência esperada de infecção por *Leptospira* spp. De 50%, nível de significância (α) de 5%, nível de confiança de 95% e margem de erro de 8%, encontrando-se um n de 151 animais que foram avaliados sem predileção por sexo, raça ou idade. As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia cefálica e centrifugadas a 1600xg por 10 minutos e o soro foi acondicionado em microtubos de 1,5 mL, identificados, e congelados a -20°C até o momento do uso.

Soroaglutinação microscópica (SAM)

A pesquisa de anticorpos para *Leptospira* spp. foi realizada de acordo com o Manual Técnico de Leptospirose, do Ministério da Saúde (12), utilizando-se 29 sorovares de *Leptospira* spp., como segue: *Australis*, *Bratislava*, *Autumnalis*, *Butembo*, *Castellonis*, *Bataviae*, *Canicola*, *Whitcombi*, *Cynopteri*, *Djasiman*, *Sentot*, *Gryppotyphosa*, *Hebdomadis*, *Copenhageni*, *Icterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Panama*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Hardjo Prajitno*, *Hardjo Miniswajezak*, *Hardjo C.T.G.*, *Hardjo Bovis*, *Wolffi*, *Shermani*, *Tarassovi*, *Andamana* e *Patoc*. Cada amostra de soro foi diluída inicialmente a 1:50, considerando-se como reação positiva quando 50% ou mais de leptospiras estavam aglutinadas, pesquisando-se o título final até a diluição onde ocorreu 50% ou mais de aglutinação de leptospiras, considerando-se como positivas a partir do título 100.

Diagnóstico molecular – Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada nas 151 amostras de soro, positivas e negativas para anticorpo anti-*Leptospira* spp., para expor o DNA bacteriano. A extração e purificação foi realizada utilizando-se kit de extração Illustra blood genomic Prep Mini spin kit (GE Healthcare Life Sciences do Brasil Ltda.[®]), com algumas alterações, conforme instrução do fabricante, e avaliado em espectrofotômetro.

Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

O DNA de *Leptospira* spp. foi amplificado pelos *primers* Lep1 (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') e Lep2 (5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3'), desenhados para o gene 16S ribossomal RNA de *Leptospira interrogans* (GenBank [X17547.1]), que amplifica um região com 330 pares de bases (bp), como descrito por Mérien et al. (13). Utilizou-se 25 µL contendo 1X tampão de PCR (10 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 10 µmol de cada primer, 10 ng DNA purificado, e 0,2 U.µL⁻¹ de Platinum *Taq* DNA polimerase.

Utilizando-se termociclador Mastercycler ep 432 gradient (Eppendorf, USA) e o seguinte protocolo: denaturação inicial de 94° C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94° C por 1 min, 63° C por 1 min e 30s, e uma extensão final de 72° C por 2 min. Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, e submetido à eletroforese em tampão TBE (0,09 M Tris-HCl, 0,09 M ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3) por 60 min sob 80V (Electrophoresis Power Supply Model EPS 301; Life Technologies, EUA). Os fragmentos de amplificação foram visualizados em sistema GelDoc-It[™] Imaging, utilizando-se o software VisionWorks[®] LS (UVP, EUA).

PCR quantitativa (qPCR): determinação da carga bacteriana

A única amostra de soro positiva na cPCR foi submetida à qPCR para a determinação da carga bacteriana utilizando-se os mesmos *primers* direcionados para a região alvo Lep1 e Lep2, amplificando um produto de 330 pb, utilizando o sistema SYBR Green, com as mesmas temperaturas e tempo de denaturação, pareamento e extensão. A reação foi processada e visualizada em equipamento de qPCR.

Análise dos dados

Os dados epidemiológicos e resultados da pesquisa de anticorpos para *Leptospira* spp. foram tabulados em planilha Excel. As associações entre as variáveis epidemiológicas e os

resultados da sorologia foram analisadas pelos testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, considerando-se nível de significância (α) de 5% (14). Todos os testes foram realizados em programa EpiInfoTM v.3.5.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 151 animais, 59(35,1%) foram sororreagentes pelo menos para um sorovar. Os sorovares encontrados e as respectivas titulações encontram-se na Tabela 1. Os resultados das análises da associação dos dados epidemiológicos e animais sororreagentes na tabela 2. Na reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) apenas um animal foi positivo e na qPCR a única amostra de soro positiva apresentou carga bacteriana de 14.829.830 leptospiaras/mL.

Tabela 1. Soroprevalencia, sorovares e títulos de anticorpos para os respectivos sorovares de leptospiaras pela SAM. Botucatu, 2014.

Sorovares	N ^a	%	Títulos						
			100	200	400	800	1600	3200	6400
<i>Copenhageni</i>	14	23,73	4	4	4	1	2	-	-
<i>Djasiman</i>	11	18,64	7	4	-	-	-	-	-
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	10	16,95	2	3	3	-	-	1	1
<i>Gryppotyphosa</i>	6	10,17	1	2	1	2	-	-	-
<i>Canicola</i>	6	10,17	4	-	2	-	-	-	-
<i>Australis</i>	3	5,08	1	2	-	-	-	-	-
<i>Bratislava</i>	2	3,39	1	-	-	1	-	-	-
<i>BTU (Botucatu)</i>	1	1,70	1	-	-	-	-	-	-
<i>Canicola + Djasiman*</i>	1	1,70	1	-	-	-	-	-	-
<i>Canicola + Gryppotyphosa*</i>	1	1,70	1	-	-	-	-	-	-
<i>Canicola + BTU*</i>	1	1,70	-	-	-	1	-	-	-
<i>Autumnalis + Djasiman*</i>	1	1,70	-	1	-	-	-	-	-
<i>Australis + Copenhageni*</i>	1	1,70	-	-	-	-	-	-	1
5 sorovares co-aglutinantes [†]	1	1,70	1	-	-	-	-	-	-
TOTAL	59	100,0	23	15	10	5	2	1	2

Legenda: ^aN número de animais reagentes; * Coaglutinação; [†] Sorovares Australis, Bratislava, Djasiman, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae.

Um mesmo animal pode reagir para mais de um sorovar considerando-se como responsável pela infecção o de maior título, e como co-aglutinantes os demais sorovares reagentes. A grande maioria dos animais responderam ao sorovar *Copenhageni* (23,73%) do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*. Este sorovar é mantido por roedores sinantrópicos, com alta prevalência em cães e humanos nas grandes metrópoles brasileiras (15). O sorovar *Icterohaemorrhagiae* mostrou-se reagente em 16,95% dos animais, com títulos elevados em dois animais (Tabela 1). O sorovar *Canicola* foi encontrado em 10,17% das amostras com outros sorovares co-aglutinantes.

Leptospiaras patogênicas dos sorogrupos *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola* estão associadas à maioria dos casos clínicos de leptospirose em cães, embora a infecção por leptospiaras por outros sorogrupos também tenha sido demonstrada por técnicas sorológicas (16). O sorovar *Djasiman* (18,64%) é um sorovar frequente em outros estudos (4-6).

Encontrou-se co-aglutinação em seis animais para cinco sorovares. Na maioria das regiões tropicais, prevalece a infecção canina por leptospiros dos sorogrupos *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola* (17).

Tabela 2. Associação entre variantes epidemiológicas e os resultados na SAM, para leptospirose. Botucatu, 2014.

Variáveis		N	SAM ^a	Variável (%); IC95% ^b	OR (IC95%) ^c	P ^d
Sexo	Macho	96	40	41,67; 32,30 – 51,69	1,35 (0,68 – 2,69)	0,25 ^e
	Fêmea	55	19	34,54; 23,36 – 47,81		
Idade	Até 1 ano	3	1	33,33; 6,76 – 80,59	-	0,67 ^f
	1 < n ≤ 5 anos	35	13	37,14; 23,14 – 53,78		
	5 < n ≤ 10 anos	55	25	45,45; 32,99 – 58,53		
	> 10 anos	58	20	34,48; 23,55 – 47,39		

Legenda: ^a Positivos para a pesquisa de anticorpos pela SAM quando título ≥ 100; ^b Frequência de reagentes baseada na variável estudada, com intervalo de confiança de 95%; ^c OR: *Odds ratio*; ^d P: valor de P para $\alpha = 5\%$; ^e Teste Exato de Fisher; ^f Teste de Qui-quadrado.

O sorovar com maior título foi o *Icterohaemorrhagiae*, sendo de 3200 UI em um animal e 6400 UI em outro. Os animais podem apresentar títulos variáveis e muitas vezes somente de contato com o agente, como 100 UI ou 200 UI, podendo significar somente infecção, e as vezes resíduo de anticorpo como resposta a vacinação. Títulos maiores podem indicar doença, e o animal pode tornar-se reservatório com eliminação do agente pela urina na fase de leptospirúria, contaminando o ambiente, e assim infectando outros animais e até humanos (3).

Não houve diferença significativa nas variáveis epidemiológicas como a idade, discordante de outros trabalhos (5). Com relação ao sexo, os machos apresentaram 1,35 vezes mais chance de infecção em relação às fêmeas, resultado similar aos encontrados por Batista et al. (18), onde os machos apresentaram 1.38 mais chances de se infectarem.

A única amostra de soro positiva na PCR convencional, revelou carga bacteriana na qPCR, de 14.829.830 leptospiros/mL. Este fato mostra que apesar do animal se encontrar clinicamente normal, o mesmo apresenta leptospiros circulantes, podendo servir como reservatório com a eliminação de leptospiros pela urina.

No caso de micro-organismos que apresentam maior dificuldade para seu isolamento, a utilização da PCR é de grande importância, já que permite detectar pequenas quantidades de DNA do patógeno, pela sua alta sensibilidade (19). Ela vem sendo utilizada cada vez mais na clínica diária e não somente em pesquisa (14,20,21), melhorando a sensibilidade diagnóstica em muitas situações.

CONCLUSÕES

O sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* com os sorovares *Copenhageni* e *Icterohaemorrhagiae* foram os mais frequentes, e responderam com títulos mais elevados. Com relação à idade, não houve diferenças entre as faixas etárias e os machos apresentaram 1,35 vezes mais chance de se infectarem em relação às fêmeas.

Sugere-se a realização com maior frequência de exames sorológicos para leptospirose em animais recebidos em Centros de Controle de Zoonoses, como atividade de vigilância, pois os cães fazem parte da cadeia epidemiológica de transmissão da leptospirose humana, pela possibilidade de eliminação da leptospiros pela urina. Desta forma pode-se conhecer a dispersão dos vários sorovares no meio ambiente e os riscos de infecção para humanos e animais.

REFERÊNCIAS

1. Coiro CJ, Langoni H, Da Silva RC, Ullmann LS. Fatores de risco para leptospirose, leishmaniose, neosporose e toxoplasmose em cães domiciliados e peridomiciliados em Botucatu-SP. *Vet Zootec*. 2011;18(3):393-407.
2. Villanueva SYAM, Ezoë H, Baterna RA, Yanagihara Y, Muto M, Koizumi N, et al. Serologic and molecular studies of leptospira and leptospirosis among rats in the Philippines. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(5):889-98.
3. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Mathias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(12):757-771.
4. Fonzar UJD, Langoni H. Geographic analysis on the occurrence of human and canine leptospirosis in the city of Maringá, state of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(1):100-5.
5. Mascoll R, Vasconcelos AS, Pinheiro SR, Moraes Z. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica de 1999. *Arq Inst Biol, São Paulo*. 2001;69(2):25-32.
6. Modolo JR, Langoni H, Padovani CR, Shimabukuro FH, Mendonça AO, Victória C, et al. Investigação soropidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2006;43(5):598-604.
7. Lavinsky MO, Said RA, Strenzel GMR, Langoni H. Seroprevalence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in dogs in Bahia, Brazil. *Prev Vet Med*. 2012;106(1):79-84.
8. Kikuti M, Langoni H, Nobrega DN, Corrêa APFL, Ullmann LS. Occurrence and risk factors associated with canine leptospirosis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2012;18(1):124-7.
9. Fayne S. *Leptospira and leptospirosis*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc; 1994.
10. Centers for Disease Control and Prevention. *Epi Info* [Internet]. Atlanta; 2002 [cited 2012 Mar 14]. Available from: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>>.
11. Dias RA, Garcia RC, Silva DF, Amaku M, Ferreira Neto JS, Ferreira F. Estimativa de populações canina e felina domiciliadas em zona urbana do Estado de São Paulo. *Rev Saude Publica*. 2004;38(4):565-70.
12. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. *Manual de Leptospirose*. 2a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 1995.
13. Mérien F, Amouriax P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 1992;30(9):2219-24.
14. Triola MF. *Introdução à estatística*. 9a ed. Rio de Janeiro: LTC; 2005.

15. Rodrigues AMA, Vasconcelos SA, Gonçalves AP, Moraes ZM, Souza GO, Hagiwara MK. Anticorpos revelados pelo teste de inibição do crescimento de leptospiros in vitro (TICL) contra os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni em cães adultos revacinados anualmente com vacina comercial contendo bacterinas dos sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Pomona. *Pesq Vet Bras.* 2013;33(5):627-34.
16. Stokes JE, Kaneene JB, Schall D, Kruger JM, Miller R, Kaiser L, et al. Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2007;230(11):1657-64.
17. Suepaul SM, Carrington CVF, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA. Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. *Epidemiol Infect.* 2010;138(7):1059-70.
18. Batista CSA, Alves CJ, Azevedo SS, Vasconcelos SA, Morais ZM, Clementino IJ, et al. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2005;57 Supl 2:179-85.
19. Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogen: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clin Chim Acta.* 2006;363(1-2):206-20.
20. Lilebaum W, Vargas R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Ritschzenhain LJ, et al. Identification of leptospiros spp. carriers among seronegative goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci.* 2009;87(1):16-9.
21. Hamond C, Martins G, Lilebaum W, Medeiros MA. PCR detection of leptospiral carriers among seronegative horses. *Vet Rec.* 2012;171:105-6.

Recebido em: 19/05/2014

Aceito em: 25/06/2015

MONITORAMENTO DA AQUISIÇÃO DE IMUNIDADE PASSIVA EM CORDEIROS COM INGESTÃO VOLUNTÁRIA DE COLOSTRO PELA DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL SÉRICA

Luana de Cássia Bicudo¹
Raimundo Souza Lopes²
Regina Kiomi Takahira²
Leandro Rodello¹
Sony Dimas Bicudo¹

RESUMO

Devido à placenta dos pequenos ruminantes não permitir a passagem de imunoglobulinas para o feto, os neonatos adquirem anticorpos exclusivamente pela ingestão do colostro nas primeiras horas de vida, o que garante a defesa imunológica no período neonatal até que seu próprio organismo seja capaz de produzir imunoglobulinas. Com o presente estudo objetivou-se avaliar a possibilidade de monitorar a aquisição da imunidade passiva em cordeiros com ingestão voluntária do colostro pela determinação sérica de proteína total (PT) por refratometria. Foram utilizados 17 cordeiros da raça Santa Inês divididos em dois grupos. Em 10 cordeiros recém-nascidos (Grupo Experimental - GE) foram avaliados ao nascimento e após 6 horas: peso, volume globular (Ht), proteína total sérica por refratometria e espectrofotometria e as frações de albumina e globulina séricas por espectrofotometria. Exceto pela avaliação do peso, os mesmos parâmetros foram avaliados em 7 cordeiros nascidos há 72 horas (Grupo Referência - GR) que haviam permanecido desde o nascimento com as mães e com ingestão voluntária de colostro *ad libitum*. Os dados foram analisados por estatística descritiva determinando-se as medidas de tendência central e suas dispersões, sendo as médias comparadas pelo teste T, estabelecendo-se para algumas variáveis o coeficiente de correlação de Pearson. Pelo método de refratometria obteve-se média de valores para proteína sérica total de 4,0 ($\pm 0,1$) g/dL logo após o nascimento, 5,3 ($\pm 0,3$) g/dL seis horas após nascimento e 6,2 ($\pm 0,5$) às 72 horas. Foi demonstrado que com seis horas após o nascimento é possível identificar cordeiros com capacidade diferenciada na absorção das imunoglobulinas, por haver um marcado aumento da concentração de globulina neste intervalo de tempo e correlação positiva ($r=0,7345$ a $0,7584$; $p<0,05$) desta com a proteína total avaliadas no soro por meio de refratometria. Com isto, torna-se possível a detecção precoce de animais carentes e a adoção de estratégias de incremento da imunidade passiva em cordeiros.

Palavras-chave: colostro, imunidade passiva, cordeiro, ovino.

MONITORING OF ACQUISITION OF PASSIVE IMMUNITY IN LAMBS WITH VOLUNTARY COLOSTRUM INTAKE BY DETERMINING THE SERUM TOTAL PROTEIN

ABSTRACT

Due to the small ruminant placenta does not allow passage of immunoglobulins to the fetus, newborns get antibodies exclusively through ingestion of colostrum within the first hours of life, which guarantees the immune defense in the neonatal period until its own body is capable

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, área de Reprodução Animal. Contato principal para correspondência, FMVZ/UNESP-Botucatu.

² Professor(a) do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ/UNESP-Botucatu

of producing immunoglobulins. The present study aimed to evaluate the possibility to monitor the acquisition of passive immunity in lambs with voluntary ingestion of colostrum by determining serum total protein (TP) by refractometry. They were used 17 Santa Inês lambs divided into two groups. In 10 newborn lambs (Experimental Group - EG) were assessed at birth and after 6 hours: weight, packed cell volume (PCV), serum total protein by refractometry and spectrophotometry, and the fractions of albumin and globulin by spectrophotometry. Except for the evaluation of the weight, the same parameters were evaluated in 7 newborn lambs with 72 hours (Reference Group - RG) who had remained since birth with mothers and voluntary intake of colostrum *ad libitum*. Data were analyzed using descriptive statistics by determining the measure of central tendency and their dispersions, the means were compared by T test, settling for some variables, the Pearson correlation coefficient. By the method of refractometry, there were obtained average values for serum total protein of 4.0 (\pm 0.1) g/dL after birth, 5.3 (\pm 0.3) g/dL six hours after birth and 6.2 (\pm 0.5) at 72 hours. It has been shown that six hours after birth the lambs can be identified with different absorption capacity of the immunoglobulins, because there is a marked increase in globulin concentration during this time and positive correlation ($r = 0.7345$ to 0.7584 , $p < 0.05$) between this protein and the serum total protein measured by refractometry. Therefore, it becomes possible early detection of needy animals and adoption of strategies for increasing passive immunity in lambs.

Keywords: colostrums, passive immunity, lamb, sheep.

MONITOREO DE LA ADQUISICIÓN DE LA INMUNIDAD PASIVA EN CORDEROS CON LA INGESTION VOLUNTARIA DEL CALOSTRO POR LA DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA SÉRICA TOTAL

RESUMEN

Debido a la placenta de los pequeños rumiantes no permitir el paso de inmunoglobulinas para el feto, los recién nacidos reciben anticuerpos exclusivamente a través de la ingestión de calostro durante las primeras horas de vida, lo que garantiza la defensa inmune en el período neonatal hasta que su propio cuerpo sea capaz de producir inmunoglobulinas. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la posibilidad de controlar la adquisición de la inmunidad pasiva en corderos con la ingestión voluntaria de calostro por la determinación de la proteína sérica total (PT) por refractometría. Se utilizaron 17 corderos Santa Inés divididos en dos grupos. En 10 corderos recién nacidos (Grupo Experimental - GE) se evaluaron en el nacimiento y después de 6 horas: el peso, el volumen celular empacado (Ht), la proteína sérica total por refractometría y espectrofotometría, y los valores de albúmina y globulina mediante espectrofotometría. Excepto para la evaluación del peso, los mismos parámetros fueron evaluados en 7 corderos nacidos hace 72 horas (Grupo de Referencia - GR) que habían permanecido desde su nacimiento con las madres y con el consumo voluntario de calostro *ad libitum*. Los datos fueron analizados utilizando estadística descriptiva mediante la determinación de la medida de tendencia central y de sus dispersiones, las medias se compararon mediante la prueba T, estableciendo para algunas variables, el coeficiente de correlación de Pearson. Por el método de refractometría se obtuvieron valores promedio para la proteína total en suero de 4,0 (\pm 0,1) g/dl inmediatamente después del nacimiento, 5,3 (\pm 0,3) g/dl seis horas después del nacimiento y 6,2 (\pm 0,5) a las 72 horas. Se ha demostrado que seis horas después del nacimiento se pueden identificar corderos con diferenciada capacidad de absorción de inmunoglobulinas, porque hay un marcado aumento en la concentración de globulina en este intervalo de tiempo y la correlación positiva ($r = 0,7345$ a $0,7584$, $p < 0.05$) de la misma con la proteína total en suero medido por refractometría. Con esto, se hace

posible la detección temprana de los animales necesitados y la adopción de estrategias para aumentar la inmunidad pasiva en los corderos.

Palabras clave: calostro, inmunidad pasiva, cordero, ovejas.

INTRODUÇÃO

Nos ruminantes a placenta é impermeável às imunoglobulinas (Ig), não sendo possível a transferência destas para o feto durante a gestação (1). A imunidade no recém-nascido é adquirida pela ingestão do colostro que confere um aporte de imunoglobulinas a serem absorvidas no trato intestinal por um determinado prazo, resultando níveis plasmáticos adequados à proteção contra as diferentes formas de infecção (2).

Quando há dúvida se o recém-nascido mamou ou sobre a quantidade de colostro ingerido, deve-se realizar uma suplementação de colostro (3,4,5).

Na tentativa de melhor compreender a aquisição da imunidade passiva em cordeiros, têm-se desenvolvido estudos sobre o mecanismo de absorção dessas proteínas (6,7).

A proteína total (PT) sérica representa a somatória das frações albumina e globulinas. As variações dos valores séricos da proteína total no recém-nascido decorrem das flutuações do estado de hidratação e principalmente da absorção das imunoglobulinas de origem colostrais (2).

Objetivou-se avaliar as variações ocorridas nos valores de PT ao nascimento e após seis horas, pelo método refratométrico, na tentativa de validar a utilização dessa prática como referencial da ingestão voluntária de colostro em cordeiros da raça Santa Inês.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 17 cordeiros da raça Santa Inês divididos em dois grupos. Em 10 cordeiros recém-nascidos (Grupo Experimental - GE), foram avaliados ao nascimento e após seis horas, o peso, o volume globular (Ht), a proteína total e as frações albumina e globulina.

Ocorrido o nascimento e respeitado o tempo necessário ao estabelecimento de vínculo materno/fetal pós-parto, anteriormente à primeira mamada, realizou-se a avaliação do peso dos cordeiros em balança com precisão decimal e obtiveram-se três mL de sangue por venopunção jugular. De imediato, procedeu-se a realização do volume globular com o sangue dos cordeiros utilizando-se centrífuga de microhematócrito (Fanem), e o volume remanescente das amostras foi disposto de forma inclinada para os procedimentos de separação do soro sanguíneo. Decorrido o tempo de 120 minutos suficientes para a retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas (Fanem, centrífuga Baby[®]) em intensidade de 1600xg por quinze minutos para obtenção do sobrenadante.

Por refratometria (Refratômetro Atago[®]), foram determinados os valores de PT (g/dL) no soro dos cordeiros advindo do capilar de microhematócrito e também no soro após retração do coágulo e centrifugação. As amostras de soro foram então congeladas (-20°C) e processadas posteriormente no Laboratório de Patologia Clínica da FMVZ UNESP Botucatu para a determinação bioquímica da PT (técnica do Biureto - g/dL) e albumina sérica (técnica do Verde de Bromocresol - g/dL), sendo obtida a proporção da fração de globulina (g/dL) por diferença, e de PT por espectrofotometria (Celm – SB190).

Os cordeiros permaneceram junto às mães de forma a amamentarem-se voluntariamente de colostro. Decorridas seis horas do parto, os cordeiros foram novamente pesados e neles procedeu-se nova venopunção jugular com a repetição dos processamentos das amostras.

Em um grupo de sete cordeiros Santa Inês nascidos há 72 horas, permanecidos desde o nascimento com as mães e com ingestão voluntária de colostro *ad libitum* (Grupo Referência - GR), foram coletados três mL de sangue por venopunção jugular e após os procedimentos de

retração do coágulo e centrifugação, foram obtidos os valores séricos de PT por refratometria. O remanescente do soro foi congelado (-20°C) e posteriormente processado para a determinação bioquímica da proteína total e albumina séricas por espectrofotometria conforme descrito anteriormente, sendo obtida pela diferença entre estas, a proporção da fração de globulina.

Os dados foram analisados por estatística descritiva, determinando-se as medidas de tendência central e suas dispersões, sendo as médias comparadas pelo teste T, estabelecendo-se para algumas variáveis o coeficiente de correlação de Pearson (8).

RESULTADOS

O peso e o volume globular (Ht) ao nascer e os obtidos seis horas após o nascimento dos cordeiros do GE foram respectivamente $3,7 \pm 0,4\text{Kg}$ e $3,9 \pm 0,2\text{Kg}$ ($P > 0,05$) e $48,7 \pm 2,5\%$ e $44,4 \pm 2,7\%$ ($P < 0,05$).

As avaliações das PT realizadas nos animais dos GE e GR pelos métodos de refratometria ou espectrofotometria são apresentadas na Tabela 1. Observou-se um aumento nos valores da PT às seis horas após o nascimento nos animais mantidos em amamentação voluntária de colostro independente do método utilizado na avaliação ($P < 0,05$).

Os valores de PT obtidos nos cordeiros do GR foram semelhantes aos valores do GE seis horas após o nascimento quer aqueles obtidos por refratometria ou por espectrofotometria ($P > 0,05$). Ao serem comparados os valores de PT no soro obtido do capilar após a realização do Ht e o obtido após a retração do coágulo/centrifugação, avaliados por refratometria, não se observou diferença entre eles ($P > 0,05$). Entretanto, ao serem comparados os métodos, considerando o mesmo momento, os valores obtidos por espectrofotometria, utilizando-se a técnica do Biureto, foram sempre superiores ($p < 0,05$).

Os valores encontrados para concentração de albumina, avaliada por espectrofotometria, e fração globulina por dedução, obtidas em soro após retração do coágulo/centrifugação em cordeiros ao nascimento e seis horas após (Grupo Experimental) e em cordeiros nascidos há 72 horas (Grupo Referência) e mantidos com amamentação voluntária do colostro *ad libitum* estão apresentados na Tabela 2.

Os valores de albumina sérica para os cordeiros do GE (Tabela 2) não diferiram nos dois momentos estudados e nem em relação aos do GR ($P > 0,05$). Os valores de globulina obtidos nos cordeiros do GR foram semelhantes aqueles do GE seis horas após o nascimento ($P > 0,05$), porém, foi observado o aumento das globulinas nos cordeiros do GE às seis horas após o nascimento nos animais mantidos em amamentação voluntária de colostro em relação aos valores obtidos logo após o nascimento ($P < 0,05$).

Observou-se que o coeficiente de variação para os valores de albumina sérica foi homogêneo para os três momentos estudados variando de 11,8% a 13,6%. Entretanto, os maiores coeficientes de variação em relação à avaliação das concentrações de globulina foram observados nos cordeiros do GE às seis horas após o nascimento, mantidos em amamentação voluntária de colostro (68,8%) e naqueles do GR (45,9%). A amplitude de variação desse parâmetro nos mencionados momentos indica a variabilidade encontrada. Para os cordeiros do GE seis horas após o nascimento, foi obtida correlação positiva e significativa entre as concentrações de globulina com as de PT obtidas por refratometria ou por espectrofotometria como se segue: globulina vs PT no soro do tubo capilar após o Ht, $r = 0,7341$ ($P < 0,05$); globulina vs PT por refratometria no soro² após retração de coágulo/centrifugação, $r = 0,7584$ ($P < 0,05$) e globulina vs PT por espectrofotometria no soro³ após retração de coágulo/centrifugação, $r = 0,9949$ ($P < 0,0001$).

Tabela 1. Médias \pm erro padrão, coeficiente de variação (%) e amplitude de variação da concentração de proteína total, avaliada por refratometria (Soro tubo capilar¹ e Soro²) ou espectrofotometria (Soro³), em cordeiros Santa Inês ao nascimento e seis horas após, mantidos com ingestão voluntária do colostro e em cordeiros (Grupo Referência) nascidos há 72 horas e mantidos com amamentação voluntária do colostro *ad libitum*.

PROTEÍNA TOTAL (g/dL)	MOMENTO EM RELAÇÃO À INGESTÃO DE COLOSTRO		
	Nascimento* (n=10)	6 horas* (n=10)	72 horas (n=7)
Soro Tubo Capilar ¹	4,0 \pm 0,1 ^{bB} 11,1% 3,4 a 4,8	5,4 \pm 0,3 ^{bA} 20,0% 4,4 a 7,2	-
Soro ²	4,0 \pm 0,1 ^{bB} 8,0% 3,4 a 4,4	5,3 \pm 0,3 ^{bA} 16,1% 4,2 a 6,8	6,2 \pm 0,5 ^{bA} 20,0% 4,2 a 7,8
Soro ³	4,1 \pm 0,3 ^{aB} 20,4% 2,7 a 5,3	6,8 \pm 0,9 ^{aA} 42,1% 4,4 a 11,0	6,8 \pm 0,7 ^{aA} 24,5% 4,5 a 8,5

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas apresentam diferença entre si (P<0,05). * amostras pareadas nos mesmos animais; 1 - Soro do capilar após Ht; 2 e 3 - Soro após retração do coágulo/centrifugação

Tabela 2. Média \pm erro padrão, coeficiente de variação (%) e amplitude de variação da concentração de albumina avaliada por espectrofotometria; e fração globulina por dedução, obtidas em soro após retração do coágulo/centrifugação em cordeiros Santa Inês ao nascimento e seis horas após, mantidos com ingestão voluntária do colostro e em cordeiros nascidos há 72 horas (Grupo Referência) e mantidos com amamentação voluntária do colostro *ad libitum*.

FRAÇÃO (g/dL)	MOMENTO EM RELAÇÃO À INGESTÃO DE COLOSTRO		
	Nascimento* (n=10)	6 horas* (n=10)	72 horas (n=7)
Albumina	2,7 \pm 0,1 13,6% 1,9 a 3,0	2,9 \pm 0,1 11,8% 2,5 a 3,6	2,8 \pm 0,1 12,9% 2,6 a 3,4
Globulina	1,4 \pm 0,2 ^B 37,6% 2,5 a 3,6	3,9 \pm 0,8 ^A 68,8% 1,2 a 8,0	4,0 \pm 0,7 ^A 45,9% 2,8 a 5,9

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas linhas apresentam diferença entre si (P<0,05). *amostras pareadas nos mesmos animais.

DISCUSSÃO

Embora não tenha havido variação no peso, houve diminuição nos valores do Ht indicando não ter havido desidratação nas primeiras horas de vida, tipicamente observada em bebês humanos (9).

Devido ao fato dos ruminantes dependerem exclusivamente da ingestão de colostro logo após o parto para adquirirem proteção imunológica (10), a falha na transferência de imunidade passiva é a maior causa de aumento da suscetibilidade a agentes infecciosos em neonatos (11).

A detecção de falhas na transferência de imunidade passiva pode ser realizada por diferentes métodos de dosagem de proteína total e imunoglobulinas séricas em cordeiros e cabritos neonatos (12,13).

A concentração de PT reflete a quantidade de albumina e globulinas, podendo ser utilizada como indicativo de falha na transferência de imunidade passiva. É um teste simples, rápido e acessível, porém pouco específico (14).

Os valores encontrados para proteína total sérica pelo método de refratometria confirmam os encontrados por O'Brien e Sherman (12) que estabeleceram o valor de 5,4 g/dL como referência mínima de adequada transferência de imunidade passiva. Segundo Ahmad et al. (13) concentrações menores que 5mg/dL de proteína total às 24 horas de vida indicam hipogammaglobulinemia.

Em trabalho realizado por Chen et al. (3) em cabritos, as concentrações de proteína total sérica por espectrofotometria foram superiores às encontradas no presente estudo, representadas por 9,4 g/dL ao nascimento. Assim como os encontrados por Bekele et al. (15) de 8,39 g/dL de proteína total em cordeiros com 48 horas de vida, que foram superiores aos valores obtidos em todos os momentos deste trabalho.

A superioridade dos valores de PT obtidos por espectrofotometria, utilizando-se a técnica do Biureto, em relação aos encontrados por refratometria também foram obtidos por Ahmad et al. (13) ao compararem ambos os métodos.

A Albumina sérica pode ser mensurada pela técnica do Verde de Bromocresol com leitura por espectrofotometria e a determinação da concentração de globulina sérica é obtida pela diferença entre PT e albumina (13).

Embora se tenha utilizado um método diferente, os valores encontrados para concentração de globulina 6 horas e 72 horas após o nascimento são semelhantes aos observados por Bekele et al. (15), com média de 3,96 g/dL de imunoglobulina sérica, em cordeiros com 48h de vida pela turbidez em sulfato de zinco.

Além do método de refratometria ser representativo da aquisição de imunoglobulinas, observou-se que é indiferente o uso da refratometria no soro obtido do tubo capilar após o Ht ou após retração de coágulo/centrifugação.

É ideal que cordeiros e cabritos ingiram 10% de seu peso em colostro nas primeiras 24h de vida, sendo, preferivelmente, ingerida metade desta quantidade dentro de 4 a 8 horas após o nascimento (16). Ahmad et al. (13) preconizam a avaliação das concentrações de imunoglobulinas em cordeiros com 24 horas de nascidos, como um parâmetro útil ao estabelecimento probabilístico de sobrevivência pós-natal. Por não haver diferença entre as concentrações de PT às 6 horas e 72 horas após o nascimento, o período avaliado no presente estudo, de 6 horas, traz benefícios quanto à precocidade na detecção e adoção de medidas corretivas nos casos de deficiências na aquisição de imunidade passiva.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir com o presente trabalho, que 6 horas após o nascimento já é possível identificar, pela determinação da PT no soro pelo método de refratometria, cordeiros com capacidade diferenciada de absorção das imunoglobulinas podendo-se, então, estabelecer precocemente estratégias para o incremento da aquisição de imunidade passiva.

Aprovação do projeto de pesquisa nº121/2009 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ- UNESP câmpus Botucatu no dia 30 de setembro de 2009.

REFERÊNCIAS

1. Prestes NC, Alvarenga FCL. *Obstetrícia Veterinária*. 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2006.
2. Sangild PT. Uptake of Colostral Immunoglobulins by the Compromised Newborn Farm Animal. *Acta Vet Scand*. 2003;98:105-22.
3. Chen JC, Chang CJ, Peh HC, Chen SY. Serum protein levels and neonatal growth rate of Nubian goat kids in Taiwan area. *Small Rumin Res*. 1999;32:153-60.
4. Vipond, J. Lambing management [Internet]. Aberystwyth, UK: Hybu Cig Cymru; 2004 [cited 2012 Mar 04]. Technical content© MLC; 2004. Available from: www.hccmpw.org.uk/medialibrary/.../Lambing%20management.pdf.
5. Lewis G, Gavin W, Goetsch AL, Taylor JB, Thonney M. Sheep and Goats. In: *Federation of Animal Science Societies. 3a ed. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*. Champaign: Federation of Animal Science Societies; 2010. p.129-42.
6. Bancharo GE, Quintans G, Vazquez A, Gigena F, La Manna A, Lindsay DR, et al. Effect of supplementation of ewes with barley or maize during the last week of pregnancy on colostrum production. *Animal*. 2007;1:625-30. doi:10.1017/S1751731107691885.
7. Loste A, Ramos JJ, Fernández A, Ferrer LM, Lacasta D, Verde MT, et al. Effect of colostrum treated by heat on immunological parameters in newborn lambs. *Livest Sci*. 2008;117:176-83. doi:10.1016/j.livsci.2007.12.012.
8. Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas: sociedade civil Mimiruá, Belém*. Brasília: CNPq; 2007.
9. McIntire DD, Bloom SL, Casey BM, Leveno KJ. Birth Weight in Relation to Morbidity and Mortality among Newborn Infants. *New Engl J Med*. 1999; 340:1234-8.
10. O'brien JP, Sherman DM. Serum immunoglobulin concentrations of newborn goat kids and subsequent kid survival through weaning. *Small Rumin Res*. 1993;11:71-7.
11. Rudovsky A, LocherL, Zeyner A, Sobiraj A, Wittek T. Measurement of immunoglobulin concentration in goat colostrums. *Small Rumin Res*. 2008;74:265-9.
12. O'brien JP, Sherman DM. Field methods for estimating serum immunoglobulin concentrations in newborn kids. *Small Rumin Res*. 1993;11:79-84.
13. Ahmad R, Khan A, Javed MT, Hussain I. The level of immunoglobulins in relation to neonatal lamb mortality in Pak-Karakul sheep. *Vet Arhiv*. 2000;70:129-39.

14. Flaiban KKMC, Balarin MRS, Ribeiro ELA, Castro FAB, Mori RM; Lisboa JAN. Transferência de imunidade passiva em cordeiros cujas mães receberam dietas com diferentes níveis de energia ou proteína no terço final da gestação. In: Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria; 2009; Belo Horizonte. Belo Horizonte: Universidade federal de Minas Gerais; 2009.
15. Bekele T, Otesile EB, Kasali OB. Influence of passively acquired colostrum immunity on neonatal lamb mortality in Ethiopian highland sheep. *Small Rumin Res.* 1992;9:209-15.
16. Morrical D, Hartwig NR, Youngs C. Colostrum and Health of Newborn Lambs [Internet]. *Sheep Management*. Ames: Iowa State University; 1995 [cited 2012 Mar 02]. Available from: www.extension.iastate.edu/publications/pm989x12.pdf.

Recebido em: 21/09/2014

Aceito em: 25/06/2015

CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E VIABILIDADE CELULAR EM CABRAS COM MASTITE SUBCLÍNICA POR *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

Sandra Renata Sampaio Salaberry¹
André Becker Simões Saidenberg
Eveline Zuniga
Fernanda Fidelis Gonsales
Priscilla Anne Melville
Nilson Roberti Benites

RESUMO

Pesquisas têm demonstrado que há uma elevação na viabilidade celular quando ocorre aumento na contagem de células somáticas (CCS) em infecções da glândula mamária em animais. O principal micro-organismo isolado em mastite subclínica dos caprinos é *Staphylococcus* spp. Os objetivos do presente estudo foram determinar a CCS, células viáveis e relacioná-las com *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite de cabras com mastite subclínica. Foram colhidas três alíquotas de amostras de leite de cabras reagentes ao teste do CMT (California Mastitis Test) para a realização da viabilidade celular, exame microbiológico e CCS. Determinou-se a viabilidade celular, após centrifugações das amostras de leite e visualização das células em microscópio, utilizando o corante azul de *Trypan* e a quantidade de CCS, utilizando equipamento de citometria de fluxo. Das amostras analisadas, 104 não tiveram isolamento de micro-organismos e 110 apresentaram isolamento de *Staphylococcus* spp., dos quais os mais frequentemente detectados foram: *S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis*. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a CCS e a viabilidade celular das amostras nas quais houve isolamento de *Staphylococcus* spp. e as amostras sem crescimento bacteriano, o que demonstrou um aumento da CCS e da viabilidade celular nas amostras de leite de cabras com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp.

Palavras-chave: azul de *Trypan*, CCS, células viáveis, estafilococos.

SOMATIC CELL COUNT AND CELL VIABILITY IN GOATS WITH SUBCLINICAL MASTITIS BY *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

ABSTRACT

Research has shown that there is an increase in cell viability when a growth in somatic cell count (SCC) in infections of the mammary gland occurs. The main microorganism isolated from subclinical mastitis in goats is *Staphylococcus* spp. The aims of this study were determined SCC, viable cells and relate them with *Staphylococcus* spp. isolated from milk samples of goats with subclinical mastitis. Three aliquots of milk samples from goats reagents to CMT test (California Mastitis Test) were collected for performing cell viability, microbiology and SCC. Cell viability, after centrifugation of milk samples and viewing the cells under a microscope, using Trypan blue dye, and the amount of SCC, through the flow cytometry equipment, were determined. A total of 104 samples had no isolation of microorganisms and 110 showed isolation of *Staphylococcus* spp., of which the most frequently detected were: *S. epidermidis*, *S. intermedius* and *S. lugdunensis*. There was a statistically significant difference between SCC and cell viability of samples in which there

¹ Laboratório de Bacteriologia e Micologia - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo. Contato principal para correspondência.

was isolation of *Staphylococcus* spp. and samples without bacterial growth, that showed an increase in SCC and cell viability in milk samples of goats with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus* spp.

Keywords: SCC, staphylococci, *Trypan* blue, viable cells.

CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS Y LA VIABILIDAD CELULAR EN CABRAS CON MASTITIS SUBCLÍNICA POR *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

RESUMEN

La investigación ha demostrado que existe un aumento en la viabilidad celular cuando se produce un aumento en el conteo de células somáticas (CCS) en infecciones de la glándula mamaria en animales. El principal microorganismo aislado en la mastitis subclínica en el ganado caprino es *Staphylococcus* spp. Los objetivos de este estudio son determinar el CCS, células viables y relacionar los con *Staphylococcus* spp. aislado de las muestras de leche de cabras con mastitis subclínica. Se cosecharon três alícuotas de las muestras de leche de cabras reactivas para CMT (California Mastitis Test) para la realización de la viabilidad celular, la microbiología y de CCS. Se determinó la viabilidad de las células después de la centrifugación de las muestras de leche y la visualización de las células bajo un microscopio, utilizando colorante azul de *Trypan*, y la cantidad de CCS a través del equipo de citometría de flujo. De las muestras, 104 no estaban aislando microorganismos y 110 mostraron aislamiento de *Staphylococcus* spp., de los cuales el detectado con mayor frecuencia fueron: *S. epidermidis*, *S. intermedius* y *S. lugdunensis*. Hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el CCS y la viabilidad celular de las muestras en las que no había aislamiento de *Staphylococcus* spp. y muestras sin crecimiento bacteriano, que mostraron un aumento en CCS y la viabilidad celular en las muestras de leche de cabras con mastitis subclínica causada por *Staphylococcus* spp.

Palabras clave: azul *Trypan*, CCS, células viables, estafilococos.

INTRODUÇÃO

A infecção intramamária interfere na contagem de células somáticas (CCS) do leite de animais. Quando os micro-organismos invadem a glândula mamária e começam a se multiplicar, ou quando o número de micro-organismos aumenta significativamente em uma glândula já infectada, o organismo direciona os leucócitos do sangue para a região afetada, com intuito de combater a agressão tecidual. Tal fato, conseqüentemente, aumenta a quantidade de células somáticas no leite (1). Em caprinos leiteiros, um dos principais micro-organismos envolvidos na mastite subclínica é *Staphylococcus* spp. que causa aumento da CCS no leite (2,3).

A viabilidade celular é reconhecida como o percentual de células disponíveis para manifestação de suas atividades e quanto maior o número de células somáticas na amostra de leite, maior a concentração de células viáveis (4). Assim, durante a fase inicial da mastite, as células polimorfonucleares migram do sangue para as glândulas infectadas, aumentando consideravelmente a viabilidade celular (5).

Estudo realizado com vacas de leite verificou que as células do leite são menos viáveis e possuem menor capacidade de responder a estímulos imunológicos do que as células que são recrutadas e que migram do sangue para o leite. Assim, as células que já estavam presentes no leite são menos efetivas na resposta imunológica e a melhor proteção da glândula mamária

contra a infecção é o rápido recrutamento de novas células de defesa do sangue, causando aumento na CCS (6).

Tendo em vista a escassez de pesquisas sobre a viabilidade celular na mastite subclínica caprina, os objetivos do presente estudo foram determinar a contagem de células somáticas e células viáveis e relacioná-las com os *Staphylococcus* spp, isolados de amostras de leite de cabras com mastite subclínica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas cabras que estavam entre o terceiro e sétimo mês de lactação. Realizou-se exame físico da glândula mamária com inspeção e palpação do úbere e tetos, identificando a presença ou não de sinais de inflamação (7).

Para identificar os animais com mastite clínica efetuou-se o teste da caneca de fundo preto segundo Santos e Fonseca (8). A identificação da mastite subclínica foi realizada pelo teste de CMT (California Mastitis Test) segundo metodologia estabelecida por Schalm et al. (9). As glândulas mamárias que apresentaram alterações nesse teste (1+, 2+ ou 3+) foram classificadas como casos de mastite subclínica. Em seguida, foram colhidas amostras de leite individuais de cada glândula reagente no CMT.

As amostras de leite foram colhidas em três alíquotas: a primeira para a avaliação da viabilidade celular, em tubos Falcon, contendo 25 mL de tampão fosfato salina (PBS) e completados com mais 25 mL de leite. A segunda amostra visou o exame microbiológico, colhidas em tubos estéreis. A terceira amostra foi para a contagem de células somáticas (CCS), colhendo 40 mL de leite em frascos contendo o conservante bronopol. A colheita das amostras de leite foi realizada assepticamente, utilizando álcool iodado 2% para a higienização das estruturas mamárias. O transporte das amostras para o laboratório foi realizado em temperatura de refrigeração, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável.

Os tubos Falcon com 25 mL de leite e 25 mL de PBS foram submetidos à centrifugação de 1000 g, durante 15 minutos à temperatura de 4°C, de acordo com Koess e Hamann (10). Após, retirou-se o sobrenadante e o botão formado foi desprendido e ressuspensionado em 1 mL de PBS e transferido para microtubos de 1,5 mL. Posteriormente, outra centrifugação de 400 g foi realizada, por 10 minutos a mesma temperatura. Ao término da segunda centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o botão novamente foi ressuspensionado em PBS. Uma terceira centrifugação foi realizada, semelhante à segunda.

Para a leitura da viabilidade celular, adicionou-se em um microtubo de 1,5 mL, 10 µL da suspensão celular e 90 µL de azul de *Trypan* (Merck, Alemanha) 0,4% e, em seguida, 10 µL desta suspensão foi colocada em câmara de Neubauer para a contagem celular no microscópio. Foram contadas 100 células por amostra de leite para que o valor da contagem da viabilidade celular fosse convertido em percentual. Para calcular o número de células viáveis, foi verificado o número de CCS de cada amostra e aplicado o percentual da viabilidade celular, obtendo-se o número de células viáveis.

As amostras de leite foram semeadas em placas de Petri contendo ágar-sangue de carneiro (5%) e incubadas a 37°C por 72 horas (11), sendo realizada a leitura das placas em 24, 48 e 72 horas de incubação. A identificação dos isolados de *Staphylococcus* spp. foi realizada com base em provas bioquímicas (12), seguida da classificação estabelecida por Murray et al. (13). Foram selecionadas as amostras de leite que apresentaram isolamento de *Staphylococcus* spp., bem como as que não apresentaram isolamento bacteriano, que foram consideradas como controle negativo.

Para a contagem de células somáticas, utilizou-se citometria de fluxo no equipamento Fossomatic (Foss, Dinamarca), de acordo com a International Dairy Federation (14).

A análise estatística utilizada para comparar a CCS e células viáveis com a presença ou ausência de *Staphylococcus* spp., SCN e SCP e espécies de estafilococos foi o teste de Mann-Whitney, utilizando o programa Instat (Graphpad, EUA) e adotando-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Das amostras analisadas, 104 não tiveram isolamento de micro-organismos e 110 apresentaram isolamento de *Staphylococcus* spp., dos quais 90 foram estafilococos coagulase negativa (SCN) e 20 estafilococos coagulase positiva (SCP). Houve maior ocorrência das seguintes espécies de estafilococos: 27 (24,5%) *S. epidermidis*, 17 (15,4%) *S. lugdunensis* e 15 (13,6%) *S. intermedius*.

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a CCS das amostras nas quais houve isolamento de *Staphylococcus* spp. e as amostras sem isolamento bacteriano (Tabela 1). Assim, animais com mastite subclínica causada por *Staphylococcus* spp. apresentaram CCS maior ($p < 0,05$) do que os animais que não tiveram isolamento de micro-organismo em amostras de leite. As medianas da viabilidade celular para as amostras de leite com e sem isolamento de *Staphylococcus* spp. foram, respectivamente, 87,28% (valor máximo: 98,63 e valor mínimo: 55,56) e 85,15% (valor máximo: 98,67 e valor mínimo: 40,00), tendo sido observada diferença estatística significativa entre estes valores ($p < 0,05$). Ao realizar o cálculo das células viáveis, também foi observada diferença estatística significativa, demonstrando maior quantidade de células viáveis nas amostras que tiveram isolamento de *Staphylococcus* spp.

Tabela 1. Mediana, valores máximo e mínimo da contagem de células somáticas e células viáveis obtidas em relação às amostras com e sem isolamento de estafilococos do leite de cabras - São Paulo - 2014.

Resultado microbiológico	CCS ($\times 10^3$)			Células viáveis ($\times 10^3$)		
	Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo
<i>Staphylococcus</i> spp.	1763,5 ^a	9999	171	1549,2 ^a	9499,1	142,5
Sem isolamento bacteriano	996 ^b	9999	88	816,7 ^b	9122,1	74,1

CCS – Contagem de células somáticas

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$)

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre a CCS e células viáveis das amostras com isolados de SCN e SCP. No entanto, ao comparar SCN e SCP com as amostras de leite sem isolamento bacteriano, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Esses resultados demonstraram que, embora não tenha sido diferente a CCS e células viáveis dos caprinos que apresentaram mastite subclínica por SCN e SCP, os valores de CCS e células viáveis apresentaram-se mais elevados em relação às amostras sem isolamento bacteriano (Tabela 2).

Tabela 2. Mediana, valores máximo e mínimo da contagem de células somáticas e células viáveis em relação às amostras de leite de cabras sem e com isolamento de estafilococos coagulase negativa e positiva. São Paulo – 2014.

Resultado microbiológico	CCS (x 10 ³)			Células viáveis (x 10 ³)		
	Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo
SCN	1695 ^a	9999	204	1450,9 ^a	8717,2	142,8
SCP	3201 ^a	9999	171	2750,4 ^a	9499,1	142,5
Sem isolamento bacteriano	996 ^b	9999	88	816,7 ^b	9122,1	74,1

CCS – Contagem de células somáticas

SCN - *Staphylococcus* coagulase negativa

SCP - *Staphylococcus* coagulase positiva

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (P<0,05)

Não houve diferença estatística significativa entre os valores de CCS e células viáveis dos micro-organismos *S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis* (p>0,05), embora *S. intermedius* tenha apresentado o valor de mediana da CCS e células viáveis mais elevados do que *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*. Foi observada diferença estatística significativa ao associar a CCS e células viáveis das amostras sem isolamento bacteriano com *S. epidermidis* e *S. intermedius* (p<0,05), os quais apresentaram maior valor de CCS e células viáveis em relação às amostras sem isolamento bacteriano. Em contraste, as estirpes de *S. lugdunensis* não apresentaram diferença estatística significativa ao associá-la com as amostras sem isolamento bacteriano (p>0,05) (Tabela 3).

Tabela 3. Mediana, valores máximo e mínimo da contagem de células somáticas e células viáveis em relação às amostras de leite de cabra sem e com isolamento de espécies de estafilococos. São Paulo – 2014.

Espécies	n	CCS			Células viáveis		
		Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo	Mediana	Valor Máximo	Valor Mínimo
<i>S. epidermidis</i>	27	2157 ^a	9999	204	1776,3 ^a	8312,2	142,8
<i>S. intermedius</i>	17	2966 ^a	9999	171	2522,9 ^a	9499,1	142,5
<i>S. lugdunensis</i>	15	1608	7807	204	1361,7	7122,3	167,9
Sem isolamento bacteriano	104	996 ^b	9999	88	816,6 ^b	9122,1	74,1

CCS – Contagem de células somáticas

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (P<0,05)

DISCUSSÃO

Estudos com caprinos demonstraram que a CCS é maior em glândulas mamárias infectadas do que nas híginas (3,15,16), conforme também foi detectado no presente estudo. Luengo et al. (17), ao avaliarem 1.304 cabras com o objetivo de identificar fatores que afetam a CCS em infecções intramamárias, verificaram que cabras sem infecção bacteriana apresentaram CCS menor do que as cabras com infecção na glândula mamária por “patógenos menores” (SCN, *Corynebacterium* spp. e *Micrococcus* spp.) e “patógenos maiores” (*Staphylococcus aureus*, enterobactéria, não-enterobactérias, *Streptococcus* spp. e *Mycoplasma* spp.). Uma pesquisa realizada com 25 animais em Israel, em que todas as cabras apresentavam uma glândula mamária infectada naturalmente por *Staphylococcus* spp. e a outra, sem isolamento de micro-organismo, demonstrou que as glândulas mamárias infectadas tiveram maior CCS em relação às glândulas mamárias sem isolamento bacteriano (18).

Não houve diferença na mediana da CCS das glândulas mamárias com isolamento de SCP ($3.201 \times 10^3/\text{mL}$) e SCN ($1.695 \times 10^3/\text{mL}$) devido à distribuição das células serem heterogêneas, o que pode ser observado pelos valores máximo e mínimo de SCP e SCN. Em contrapartida, outros estudos detectaram maior quantidade de CCS nos SCP do que SCN (3,15,17,19). Os SCN podem desenvolver mastites subclínicas persistentes, as quais também estão relacionadas a aumentos significativos da CCS e podem apresentar variações nos níveis da CCS entre 300×10^3 e 1.600×10^3 células/mL (16,18). Em contraste, no presente estudo, os valores mínimo e máximo de CCS para os SCN variaram, respectivamente, de 204×10^3 a 9999×10^3 de células/mL.

Também se verificou que os SCN e os SCP apresentaram maior quantidade de CCS em relação às amostras de leite de cabra que não tiveram isolamento bacteriano, demonstrando que a presença de micro-organismos interfere diretamente na CCS, concordando com os resultados encontrados por outros autores (3,16,17,19).

Nesse estudo, não foi observada diferença nos valores de CCS das espécies de estafilococos mais detectadas (*S. epidermidis*, *S. intermedius* e *S. lugdunensis*), coincidindo com Moroni et al. (20), que também não encontraram diferença da CCS entre *S. epidermidis* e outros SCN.

S. epidermidis e *S. intermedius* apresentaram maior número de CCS em relação às amostras de leite de cabra que não tiveram isolamento bacteriano, fato que não ocorreu para *S. lugdunensis*. Diferentemente disso, Deinhofer e Pernthaner (21) encontraram elevado valor de CCS para *S. lugdunensis* isolados de cabras com mastite clínica e tal diferença para o presente estudo pode ser justificada pelo uso somente de cabras com mastite subclínica.

A diferença nos valores de CCS de uma infecção na glândula mamária por SCN em pequenos ruminantes e em bovinos é que nos bovinos o aumento da CCS é leve ou moderado e nos caprinos o aumento da CCS é elevado, sugerindo que a glândula de pequenos ruminantes tenha aumento na resposta imunológica contra o SCN (22,23), o que pode justificar o aumento de CCS nos isolados de *S. epidermidis*. Leitner et al. (19), ao realizarem pesquisa em 103 cabras para avaliar a imunidade da glândula mamária com infecção por espécies de estafilococos, constataram que as espécies de SCN (*S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. simulans*) apresentaram elevados valores de CCS ao comparar com as cabras que não tinham infecção na glândula mamária. Neste estudo, também foram encontrados elevados valores de CCS para SCN em relação às amostras sem isolamento bacteriano.

Pesquisas sobre *S. intermedius* e a variação da CCS são escassas. Em contrapartida, muitas informações estão disponíveis na literatura sobre *S. aureus*, que também é SCP, e é responsável por causar elevado aumento na CCS de caprinos com infecção intramamária (15,17,19,22,24). Bagnicka et al. (25) classificaram as bactérias responsáveis por causar infecção intramamária caprina em grupos de “patógenos menores e maiores”, sendo que no

primeiro grupo estavam inclusos *S. aureus* e *S. intermedius* e, no segundo, SCN. Foi observado elevado aumento da CCS no grupo de patógenos maiores e menores em relação ao grupo sem infecção intramamária, conforme também foi constatado no presente trabalho, que os valores de CCS para SCN e SCP foram mais elevados do que nas amostras sem isolamento bacteriano e, além disso, não houve diferença entre a CCS de SCN e SCP.

A quantidade de células viáveis foi maior nas amostras de leite que tiveram isolamento de *Staphylococcus* spp. do que nas amostras sem isolamento bacteriano. Os resultados observados corroboram com os achados de Mehrzad et al. (26), que durante a fase inicial da mastite, as células polimorfonucleares migram do sangue para as glândulas infectadas, aumentando consideravelmente a viabilidade celular, o que justifica maior viabilidade celular nas amostras com isolamento de *Staphylococcus* spp. do que nas amostras sem isolamento bacteriano.

Outras pesquisas encontraram resultados semelhantes ao detectado neste estudo. Neste contexto, Piccinini et al. (27) avaliaram a viabilidade celular em 80 vacas e encontraram uma média de viabilidade maior no grupo de animais que apresentavam mastite subclínica por *S. aureus* ($59,69 \pm 19,60\%$) do que no grupo sem isolamento bacteriano ($49,79 \pm 19,21\%$).

Merle et al. (28) avaliaram a viabilidade celular no leite de vacas com e sem mastite e observaram viabilidade celular maior (84%) no grupo de animais com mastite severa - animais que apresentavam CCS maior que 400.000 células/mL - do que nos animais hígidos (72,6%) - com CCS menor que 100.000 células/mL. No mesmo estudo, porém, não foi avaliado o tipo de micro-organismo isolado, tendo sido considerado apenas o valor da CCS para divisão dos grupos, diferindo do presente estudo, no qual a separação dos grupos foi de acordo com a presença de *Staphylococcus* spp. e sem isolamento bacteriano.

Boulaaba et al. (29) analisaram a quantidade de neutrófilos polimorfonucleares viáveis por citometria de fluxo em amostras de leite de 25 cabras e detectaram que a média da quantidade de neutrófilos polimorfonucleares viáveis em amostras com isolamento de SCN ($73,2 \pm 12,6\%$) foi maior do que nas amostras sem isolamento bacteriano ($65,4 \pm 13,6\%$). Neste estudo, foi verificada diferença entre as amostras de leite de SCN e SCP em relação às sem isolamento bacteriano, embora a metodologia para avaliação das células viáveis empregada por Boulaaba et al. (29) tenha sido diferente.

Vale ressaltar que o percentual de viabilidade celular encontrado no presente estudo, 87,28% e 85,15% nas amostras com e sem isolamento bacteriano, respectivamente, foi maior do que os resultados encontrados por estudos similares (27,28,29). Tal achado pode ser justificado por diferentes metodologias e espécies animais utilizadas, o que torna difícil a comparação entre os experimentos existentes sobre viabilidade celular.

Foi observado que os achados encontrados para as células viáveis foram coincidentes com os da CCS, o que pode sugerir que os resultados das células viáveis podem ter sido influenciados pela CCS, já que o cálculo das células viáveis foi baseado na CCS. Entretanto, o percentual da viabilidade celular apresentou-se mais elevado nas amostras com isolamento bacteriano, concordando com resultados já apresentados por outros autores, que a viabilidade celular pode ser maior quando há aumento no número de CCS na glândula mamária (30). Portanto, mais estudos devem ser realizados para elucidar o papel das células viáveis na avaliação da saúde da glândula mamária.

CONCLUSÃO

No presente estudo verificou-se aumento da CCS e da viabilidade celular nas amostras de leite de cabras com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp., sugerindo que as células inflamatórias que são recrutadas e que migram do sangue para o leite podem apresentar maior efetividade na resposta inflamatória mamária.

REFERÊNCIAS

1. Pales AP, Santos KJG, Figueiras EA, Melo CS. A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. Rev Eletron Facul Montes Belos. 2005;1:162-73.
2. Bergonier D, Crémoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. Vet Res. 2003;34:689-716.
3. Moroni P, Pisoni G, Ruffo G, Boettcher PJ. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cells counts in Italian dairy goats. Prev Vet Med. 2005b; 69:163-73.
4. Della Libera AMMP, Birgel EH, Mori E, Kitamura SS, Mirandola RMS, Araujo WP. Isolamento de fagócitos viáveis do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) hípidas, sem elicitação, criadas no estado de São Paulo. Rev Bras Cienc Vet. 2005;12:114-7.
5. Paape MJ, Capuco AV. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. J Anim Sci. 1997;75:556-65.
6. Baumert A, Bruckmaier RM, Wellnitz O. Cell population, viability, and some key immunomodulatory molecules in different milk somatic cell samples in dairy cows. J Dairy Res. 2009;76:356-64.
7. Pugh DG. Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca; 2004.
8. Santos MV, Fonseca LFL. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. Barueri: Manole; 2007.
9. Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC. Bovine mastitis. Philadelphia: Lea e Febiger; 1971.
10. Koess C, Hamann J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. J Dairy Res. 2008;75:225-32.
11. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility tests by standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966;45:493-6.
12. Lennette EM, Balows A, Hansler JRWJ. Manual of clinical microbiology. 4th ed. Washington: American Society of Microbiology; 1985.
13. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington: Asm Press; 2007.
14. International Dairy Federation. Milk: enumeration of somatic cells - Part 2: guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. Geneva: ISO and IDF; 2006.
15. Haenlein GFW. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. Small Rumin Res. 2002;45:163-78.

16. Raynal-Ljutovac K, Pirisi A, Crémoux R, Gonzalo C. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Rumin Res.* 2007;68:126-44.
17. Luengo C, Sánchez A, Corrales JC, Fernández C, Contreras A. Influence of intramammary infection and non-infection factors on somatic cell counts in dairy goats. *J Dairy Res.* 2004;71:169-74.
18. Leitner G, Merin U, Silanikove N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *J Dairy Sci.* 2004; 87:1719-26.
19. Leitner G, Sapeiro S, Krifucks L, Weisblit L, Lavi Y, Heller ED. Systemic and local mammary gland immunity to udder infection in goats by various *Staphylococcus* species. *Small Rumin Res.* 2011;95:160-7.
20. Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Ruffo G, Carli S, Varisco G, et al. Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. *J Dairy Sci.* 2005a;88:1694-704.
21. Deinhofer M, Pernthaner A. *Staphylococcus* spp. as mastitis – related pathogens in goat milk. *Vet Microbiol.* 1995;43:161-6.
22. Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, et al. Mastitis in small ruminants. *Small Rumin Res.* 2007;68:145-53.
23. Souza FN, Blagitz MG, Penna CFAM, Della Libera AMMP, Heinemann MB, Cerqueira MMOP. Somatic cell count in small ruminants: friend or foe? *Small Rumin Res.* 2012;107:65-75.
24. Contreras A, Luengo C, Sánchez A, Corrales JC. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livest Prod Sci.* 2003;79:273-83.
25. Bagnicka E, Winnickab A, Józwick A, Rzewuska M, Strzałkowska N, Kosciuczu E et al. Relationship between somatic cell count and bacterial pathogens in goat milk. *Small Rumin Res.* 2011;100:72-7.
26. Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J Dairy Sci.* 2004;87:4150-62.
27. Piccinini R, Bronzo V, Moroni P, Luzzago C, Zeconi A. Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *J Dairy Res.* 1999;66:501-10.
28. Merle R, Schroder A, Hamann J. Cell function in the bovine mammary gland: a preliminary study on interdependence of healthy and infected udder quarters. *J Dairy Res.* 2007;74:174-9.
29. Boulaaba A, Grabowski N, Klein G. Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. *Small Rumin Res.* 2011;97:117-23.

30. Blagitz MG, Souza FN, Gomes V, Della Libera AMMP. Apoptosis and necrosis of polymorphonuclear leukocytes in goat milk with high and low somatic cell counts. *Small Rumin Res.* 2011;100:67-71.

Recebido em: 14/07/2014

Aceito em: 25/06/2015

AVALIAÇÃO DE TRATAMENTO HOMEOPÁTICO NA MASTITE OVINA SUBCLÍNICA

Roberto Mangieri Junior¹
Nilson Roberti Benites²
Priscilla Anne Melville³

RESUMO

A mastite é um problema relevante em criações de ovinos podendo ocasionar baixa produção láctea, baixo peso ao desmame, prejuízo com óbito de animais e custos com tratamento veterinário. Com o crescimento do setor de produção orgânica, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e controle de mastite. A homeopatia é alternativa importante uma vez que os medicamentos homeopáticos apresentam baixo custo e toxicidade, facilidade de administração e não atuam diretamente sobre o micro-organismo, não contribuindo assim para a ocorrência de resistência microbiana. Foi investigada a evolução microbiológica, contagem de células somáticas (CCS), de células polimorfonucleares (PMN) e células mononucleares (MN) em leite de ovinos acometidos por mastite subclínica tratados homeopaticamente. Cinquenta (n=50) animais diagnosticados com mastite subclínica foram separados em dois grupos de forma aleatória. O grupo controle (n=25) os animais receberam tratamento placebo, enquanto que o grupo homeopatia (n=25) receberam o medicamento homeopático *Phytolaca decandra* 6 CH. Procedeu-se à coleta de amostras de leite para exames microbiológicos bem como para a CCS e contagem de PMNs e MNs dos animais dos grupos controle e homeopatia, em média, 10 dias antes do início dos tratamentos e com 15 e 30 dias pós-tratamento. Os cordeiros (n=50) foram desmamados e submetidos à pesagem 60 dias após o parto. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre as CCS e frequências de PMNs e MNs dos grupos homeopatia e controle, tanto antes quanto depois do tratamento homeopático. Porém observou-se a eficiência quanto à cura microbiológica da mastite, bem como maior ganho de peso dos cordeiros cujas mães foram submetidas ao tratamento homeopático.

Palavras-chave: ovinos, homeopatia, mastite.

EVALUATION OF HOMEOPATHIC TREATMENT IN OVINE SUBCLINICAL MASTITIS

ABSTRACT

Mastitis is a relevant problem in creations of sheep and can cause low milk production, low weight at weaning, losses with death of animals and veterinary treatment costs. With the growth of the sector of organic production, it is necessary to develop new strategies for treatment and control of mastitis. Homeopathy is an alternative important since homeopathic medicines have low cost and toxicity, ease of administration and not act directly on the microorganism, not contributing to the occurrence of microbial resistance. Microbiological culture, somatic cells count (CCS), polymorphonuclear cells (PMN) and mononuclear cells (MN) were evaluated in ovine milk with subclinical mastitis and treated homeopathically.

¹ Médico Veterinário - Universidade de São Paulo. Contato principal para correspondência.

² Professor Doutor do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

³ Médica Veterinária do Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Fifty (n=50) sheep diagnosed with subclinical mastitis were separated into two groups randomly, being a control group (n=25) in which the animals received placebo treatment, whereas the other was called homeopathy group (n=25) whose animals received the homeopathic medicine *Phytolaca decandra* 6 CH. Were collected samples of milk for microbiological tests, as well as CCS and count of PMNs and MNs from control and homeopathy groups, on average, 10 days before the start of the treatments and with 15 and 30 days of the treatments. The lambs (n=50) were weaned and submitted to weighing 60 days after birth. No significant statistical difference ($P>0,05$) was verified between CCS and frequencies of PMNs and MNs of homeopathy and control groups, both before and after the homeopathic treatment. However, was noted the efficiency regarding microbiological cure of mastitis as well as the weight gain of the lambs whose ewe were subjected to homeopathic treatment.

Keywords: ovines, homeopathy, mastitis.

EVALUACIÓN DE TRATAMIENTO HOMEOPÁTICO EN LA MASTITIS OVINA SUBCLÍNICA

RESUMEN

Mastitis es un problema relevante en las creaciones de ovejas y puede causar la producción de leche baja, bajo peso al destete, prejuicios con la muerte de los animales y los costos de tratamiento veterinario. Con el crecimiento del sector de la producción orgánica es necesario desarrollar nuevas estrategias de tratamiento y control de la mastitis. La homeopatía es una alternativa importante ya que los medicamentos homeopáticos tienen bajo costo y toxicidad, facilidad de administración y no actúan directamente sobre el microorganismo, no contribuye a la aparición de resistencias microbianas. Se investigó el desarrollo microbiológico, recuento de células somáticas (CCS), células polimorfonucleares (PMN) y las células mononucleares (MN) en leche ovina con mastitis subclínica y tratados homeopáticamente. Cincuenta animales (n=50) diagnosticados con mastitis subclínica fueron separados en dos grupos al azar. Em el grupo de control (n=25) los animales recibieron tratamiento con placebo mientras que el grupo homeopatía (n=25) recibieron el medicamento homeopático *Phytolaca decandra* 6 CH. Se procedió a la recogida de muestras de leche para las pruebas microbiológicas, así como por la CCS y recuento de PMNs y MNs de los animales de los grupos control y homeopatía, en promedio, 10 días antes del inicio de los tratamientos y con 15 y 30 días después del tratamiento. Los corderos (n=50) fueron destetados y pesados 60 días después del parto. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa ($P>0,05$) entre el CCS y frecuencias de PMNs y MNs de los grupos de homeopatía y control, antes como después del tratamiento homeopático. Pero la eficiencia fue observada sobre cura microbiológica de la mastitis, así como el aumento de peso de los corderos cuyas madres fueron sometidas a tratamiento homeopático.

Palabras-clave: ovejas, homeopatía, mastitis.

INTRODUÇÃO

A mastite é um problema relevante em criações de ovinos podendo ocasionar baixa produção láctea e baixo peso ao desmame (1). Além disso, há também o prejuízo com óbito de animais e custos com tratamento veterinário (2).

A prevalência de mastite subclínica em pequenos ruminantes é de, em média, 5 a 30% do rebanho, enquanto que a incidência anual de mastite clínica é, em geral, menor que 5%, podendo aumentar esporadicamente (2,3,4).

São inúmeros os agentes etiológicos de mastite em ovinos podendo-se citar: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *S. pyogenes*, *S. intermedius*, *Mycoplasma* spp., *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*, dentre outros, embora *Staphylococcus* spp. são os micro-organismos mais prevalentes (1,5). Ao passo que *S. aureus* representa um importante patógeno na mastite clínica ovina, os estafilococos coagulase-negativos são os mais prevalentes em mastites subclínicas (3).

A mastite ovina é a principal causa para o descarte de ovelhas. A forma subclínica reduz a produção e a qualidade do leite, além de acarretar prejuízos na atividade leiteira (6,7). Paralelamente, a mortalidade de cordeiros muitas vezes tem sido atribuída à produção insuficiente de leite pelas ovelhas, decorrente de mastites clínica e subclínica (8,9).

Quanto ao tratamento, a mastite clínica deve ser tratada tão logo seja diagnosticada. Nestes casos, o sucesso terapêutico da maioria dos protocolos alopáticos deve ser avaliado considerando-se mais a redução dos sinais clínicos do que a total eliminação do patógeno da glândula mamária (10).

Tendo em vista o crescimento do setor de produção orgânica, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e controle de mastite. Neste contexto, a homeopatia é alternativa importante uma vez que os medicamentos homeopáticos apresentam baixo custo e toxicidade, facilidade de administração e não atuam diretamente sobre o micro-organismo, não contribuindo assim para a ocorrência de resistência microbiana. Estes medicamentos atuam na promoção do aumento da capacidade de resposta do hospedeiro (11).

A homeopatia teve seu grande marco com Samuel Hahnemann (1755-1843) (12), que estabeleceu os princípios do indivíduo total, baseado no princípio Hipocrático, e do medicamento único. Hahnemann (12) classificou as doenças em agudas e crônicas, na qual as doenças agudas ou matam o indivíduo ou curam-se espontaneamente. Nas doenças crônicas, “o contágio parasitário semivital” persiste mais ou menos latente. Portanto, do ponto de vista homeopático, a evolução da doença é que determina se a doença é aguda ou crônica (13).

A escassez de pesquisas sobre a homeopatia na área de produção animal, principalmente de acordo com os princípios estabelecidos por Hahnemann (12), justifica o presente estudo que procurou esclarecer aspectos da epidemiologia das mastites subclínicas em ovinos investigando-a pela avaliação da eficácia de protocolos homeopáticos para tratamento e controle da doença. Com efeito, foram realizados exames microbiológicos bem como avaliadas as contagens de células somáticas (CCS), de células polimorfonucleares (PMN) e células mononucleares (MN) em leite de ovinos acometidos por mastite subclínica e tratados homeopaticamente. Foi avaliada, ainda, a eficiência quanto à cura microbiológica da mastite, bem como se analisou a interferência quanto ao ganho de peso dos cordeiros cujas ovelhas foram submetidas aos tratamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ovinos avaliados foram provenientes de propriedades de ovinocultura da região de Campinas, Vale do Paraíba e Jarinú, no Estado de São Paulo. Os animais pertenciam às raças Dorper, White Dorper e mestiços Dorper/Santa Inês.

Foram avaliadas, durante o período de 2 anos, 122 ovelhas que se apresentavam entre a segunda e quarta lactação/parto. Os animais foram submetidos às provas de campo de Tamis (14) e California Mastitis Test (CMT) (15), para detecção de mastites clínica e subclínica, respectivamente. Amostras positivas para mastite subclínica (2 e 3+) foram coletadas para realização de exames microbiológicos, CCS e contagem de PMNs e MNs.

As amostras de leite colhidas para exames microbiológicos foram obtidas após a devida higienização dos tetos, acondicionadas em tubos estéreis. As amostras foram transportadas ao laboratório em condição de refrigeração, onde foram submetidas aos exames microbiológicos. Foram semeados 10 µL de cada amostra de leite em ágar-sangue ovino a 5%. As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C, com leituras realizadas em 24, 48 e 72 horas. Visando a pesquisa de fungos filamentosos e leveduras, foi realizado o cultivo das amostras em ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol (100 mg/L) com incubação a 25°C por 7 dias. Os micro-organismos isolados foram identificados e classificados de acordo com Murray et al. (16). Para confirmação de certos isolados foram utilizados também na classificação os sistemas RapID™ (Remel) para confirmação das identificações.

Após a coleta de leite para exame microbiológico, foram colhidas amostras de leite que foram acondicionadas em frascos plásticos contendo bronopol®. As amostras foram submetidas à contagem de células somáticas (CCS) por citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento Somacount 300® (17). Procedeu-se ainda à realização de esfregaços de cada amostra de leite colhida para exame microbiológico, os quais foram corados com Giemsa e submetidos à contagem de 100 células/esfregaço, visando avaliar a proporção de PMNs e MNs.

Os animais diagnosticados com mastite subclínica (50 animais) foram separados em dois grupos de forma aleatória, constituindo o grupo controle (25 animais), no qual os animais receberam tratamento placebo, que consistiu na administração de 30 gramas de açúcar cristal administrado ao alimento, duas vezes ao dia. No grupo homeopatia (25 animais), os animais receberam o medicamento homeopático misturado à alimentação, duas vezes ao dia, que consistiu na administração de 30 gramas de açúcar cristal impregnados com o medicamento *Phytolaca decandra* 6 CH, segundo a farmacopeia homeopática brasileira. Este medicamento foi selecionado de acordo com a repertorização (18) prévia dos sinais e sintomas clínicos da mastite, de acordo com o gênio epidêmico, definido a partir dos sinais e sintomas gerais da doença na população em estudo, visando o uso de modo curativo (12).

O medicamento homeopático e o placebo foram administrados por via oral juntamente com o concentrado administrado na alimentação. Foram adicionadas 30 gotas do medicamento em 1 kg de açúcar cristal. Cada animal do grupo homeopatia recebeu 30 gramas desta mistura, duas vezes ao dia, durante 30 dias. O grupo controle recebeu 30 gramas do açúcar cristal, sem medicação, duas vezes ao dia, durante 30 dias. Ambos os lotes começaram a receber a medicação, em média, 30 dias após o parto. O tratamento foi finalizado aos 60 dias pós-parto, em média, quando os cordeiros foram desmamados.

Procedeu-se à coleta de amostras de leite para exames microbiológicos bem como CCS e contagem de PMNs e MNs dos animais dos grupos controle e homeopatia, em média, 10 dias antes do início dos tratamentos e com 15 e 30 dias a partir da administração dos mesmos.

Os cordeiros (n=50) foram desmamados e submetidos à pesagem 60 dias após o parto.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* GRAPHPAD INSTAT (19) e os testes estatísticos empregados nas diversas análises foram: Friedman, Fisher, Wilcoxon, Análise de Variância e teste T - Student para comparar os dados de CCS, PMN, MN e ganho de peso entre os grupos pesquisados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As mastites são frequentes em ovelhas, de particular importância em animais de aptidão leiteira, mas afetando igualmente raças produtoras de carne. Estas infecções causam prejuízos econômicos consideráveis, podendo comprometer a função mamária e, ocasionalmente, resultar em óbito dos animais. As suas consequências estendem-se aos cordeiros que apresentam menor crescimento e ganho de peso (20).

Vários autores (21-25), trabalhando com mastite subclínica em ovelhas, encontraram, respectivamente, 35%, 39%, 39,1%, 57,03% e 18,3% das amostras de leite positivas ao exame microbiológico.

Estudando as mastites subclínicas em ovelhas da raça Santa Inês, um grupo de pesquisadores (26) obteve 26,6% (33/124) de positividade ao exame microbiológico no qual *Staphylococcus* coagulase-negativos foram os micro-organismos mais frequentemente isolados (19/33=57%), seguidos por *S. aureus* (5/33=15,2%), *Micrococcus* sp. (5/33=15,2%) e *Streptococcus agalactiae* (1/33=9%).

Outros pesquisadores (27) avaliaram ovelhas da raça Santa Inês e detectaram 50% das glândulas positivas ao exame microbiológico, embora somente *Staphylococcus* coagulase-positivos foram isolados. No mesmo estudo foi observada a persistência do quadro infeccioso nos animais durante e após o período de lactação.

Outros autores (24) relataram que *Staphylococcus* spp. foram os micro-organismos mais frequentemente isolados de amostras de leite de ovelhas com mastite subclínica sendo 67,9% das amostras de leite positivas para *Staphylococcus* coagulase-negativos e 9,4% para *S. aureus*.

No Quadro 1, estão apresentados os resultados dos exames microbiológicos das amostras de leite dos grupos controle e homeopatia, colhidas antes do início do tratamento e com 15 e 30 dias de tratamento, bem como a frequência de isolamentos de cada agente.

Verificou-se no presente estudo que após 15 dias do início do tratamento houve aumento ($P<0,05$) do número de amostras negativas ao exame microbiológico quando comparado com os resultados anteriores ao início do tratamento. No entanto, a porcentagem de amostras negativas do grupo homeopatia foi estatisticamente maior ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle. Este resultado significa que pode ter havido cura microbiológica espontânea de mastite subclínica ovina, mas quando estimulada pelo medicamento homeopático a porcentagem de cura foi maior ($P<0,05$) (Quadro 1).

Observou-se também que entre 15 e 30 dias de tratamento houve redução ($P<0,05$) da frequência de amostras microbiológicas negativas tanto do grupo homeopatia (71,88% com 15 dias e 56,25% com 30 dias de tratamento) quanto do grupo controle (57,69% com 15 dias e 30,77% com 30 dias de tratamento). Entretanto, observou-se que nas amostras colhidas após 30 dias de tratamento ocorreu isolamento de micro-organismos não isolados na coleta inicial, tais como *S. intermedius* (3,13% no grupo homeopatia e 7,69% no grupo controle), *S. saprophyticus* (6,25% no grupo homeopatia e 7,69% no grupo controle) e *S. epidermidis* (7,69% no grupo controle), bem como ausência de isolamentos de micro-organismos presentes na coleta anterior ao tratamento tais como *Corynebacterium bovis*, *S. haemolyticus*, *Streptococcus dysgalactiae* assim como a redução na frequência de isolamentos de *S. kloosii*. Este fato permite concluir que houve cura microbiológica espontânea, mas também ocorreu reinfecção de glândulas mamárias em ambos os grupos após 30 dias de tratamento (Quadro 1).

A frequência de amostras negativas ao exame microbiológico no grupo homeopatia (26,67% antes do início do tratamento, 71,88% com 15 dias e 56,25% com 30 dias de tratamento), foi superior estatisticamente ($P<0,05$) ao do grupo controle (38,46% antes do início do tratamento, 57,69% com 15 dias e 30,77% com 30 dias de tratamento). Este achado permite inferir que a taxa de reinfecção dos animais tratados com homeopatia foi inferior quando comparados aos animais que não receberam medicamento homeopático (Quadro 1).

Quadro 1. Isolamento de micro-organismos do leite de ovelhas com e sem tratamento homeopático com *Phytolaca decandra* 6 CH, segundo dias após o uso do medicamento e placebo. São Paulo, 2010.

Microbiológico		Antes do Tratamento		15 dias de tratamento		30 dias de Tratamento	
		N	%	N	%	N	%
Tratamento Homeopático	<i>Corynebacterium bovis</i>	2	6,67	0	0,00	0	0,00
	<i>S. chromogenes</i>	1	3,33	1	3,13	1	3,13
	<i>S. haemolyticus</i>	2	6,67	0	0,00	0	0,00
	<i>S. kloosii</i>	9	30,00	3	9,38	3	9,38
	<i>S. aureus</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	<i>S. cohnii</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	<i>S. caprae</i>	0	0,00	1	3,13	1	3,13
	<i>S. intermedius</i>	0	0,00	0	0,00	1	3,13
	<i>S. saprophyticus</i>	0	0,00	0	0,00	2	6,25
	<i>S. epidermidis</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	<i>S. dysgalactiae</i>	3	10,00	0	0,00	0	0,00
	<i>S. dysgalactiae/S. klossii</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	<i>S. dysgalactiae /S. intermedius</i>	0	0,00	0	0,00	1	3,13
	<i>S. dysgalactiae /S. haemolyticus</i>	0	0,00	1	3,13	1	3,13
	Amostra contaminada	5	16,67	3	9,38	4	12,50
	Negativo	8	26,67	23	71,88	18	56,25
Total	30		32		32		
Controle	<i>Corynebacterium bovis</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	<i>S. chromogenes</i>	0	0,00	0	0,00	1	3,85
	<i>S. haemolyticus</i>	2	7,69	0	0,00	1	3,85
	<i>S. kloosii</i>	7	26,92	4	15,38	3	11,54
	<i>S. aureus</i>	2	7,69	0	0,00	1	3,85
	<i>S. cohnii</i>	1	3,85	0	0,00	0	0,00
	<i>S. caprae</i>	0	0,00	2	7,69	3	11,54
	<i>S. intermedius</i>	1	3,85	2	7,69	2	7,69
	<i>S. saprophyticus</i>	0	0,00	1	3,85	2	7,69
	<i>S. epidermidis</i>	0	0,00	0	0,00	2	7,69
	<i>S. dysgalactiae</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	<i>S. dysgalactiae /S. klossii</i>	1	3,85	0	0,00	0	0,00
	<i>S. dysgalactiae /S. intermedius</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	<i>S. dysgalactiae /S. haemolyticus</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Amostra contaminada	2	7,69	2	7,69	2	7,69
	Negativo	10	38,46	15	57,69	8	30,77
Total	26		26		25		

Os resultados referentes às CCS, porcentagens de PMNs e MNs, estão apresentados no Quadro 2. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre as CCS dos grupos homeopatia e controle, tanto antes quanto depois dos tratamentos.

As porcentagens de PMNs e MNs (Quadro 2) estão compatíveis com os quadros de mastites subclínicas ocasionadas pelos agentes isolados, não tendo sido verificada diferença estatisticamente significativa entre estas porcentagens nos grupos homeopatia e controle, tanto antes quanto depois dos tratamentos. Outros autores (27) observaram a ocorrência de aumento de PMNs nas glândulas mamárias infectadas durante a lactação e pós desmame o que explicaria o aumento da CCS quando da infecção intramamária, onde há alta relação entre PMNs e aumento da CCS (28). Pode-se verificar, ainda, aumento estatisticamente significativo ($P<0,05$) de aproximadamente 4,5 Kg em média no peso dos filhotes que foram desmamados de ovelhas tratadas com medicamento homeopático. Este resultado pode ser creditado à melhora na saúde das fêmeas lactantes com melhora na qualidade do leite.

Quadro 2. Mediana, valores mínimos e máximos das contagens de células somáticas (CCS), das porcentagens de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) de amostras de leite de ovelhas com isolamento microbiológico negativo (Neg), *Staphylococcus* spp. (Staph) e total antes do início do tratamento, com 15 e 30 dias de tratamento, bem como a média do ganho de peso com desvio padrão antes e depois dos tratamentos homeopático* e placebo.

		Micror g	Antes do Tratamento	15 dias de tratamento	30 dias de tratamento
CCS (Cél/ml)	Homeopatia	Neg	279898 (44978-4613176)	1096478 (14997-7603263)	151356 (20989-5902011)
		Staph	683912 (43955-5482770)	1462177 (47315-7345139)	2754229 (112980-1435489)
		Total	411149 (43955-5482770)	1399587 (14997-7603263)	801678 (20989-1435489)
	Controle	Neg	433511 (93972-4886524)	1749847 (93972-6165950)	380189 (65013-4446313)
		Staph	3499452 (38019-6412096)	2523481 (182810)	2094113 (217771-6456542)
		Total	1156712 (38019-6412096)	24099054 (93972-6165950)	1145513 (65013-6456542)
PMN (Cél/ml)	Homeopatia	Neg	72,0(67,0-89,0)	74,0(58,0-963,0)	76,0(64,0-83,0)
		Staph	82,5(28,0-96,0)	82,5(-73,0-92,0)	84,0(36,0-96,0)
		Total	79,0(28,0-96,0)	77,5(58,0-96,0)	76,0(36,0-94,0)
	Controle	Neg	73,0(44,0-91,0)	76,0(44,0-94,0)	68,0(51,0-85,0)
		Staph	81,0(46,0-96,0)	83,0(63,0-96,0)	84,5(52,0-98,0)
		Total	81,0(44,0-96,0)	78,0(44,0-96,0)	77,0(51,0-98,0)
MN (Cél/ml)	Homeopatia	Neg	27,5(11,0-33,0)	26,0(4,0-42,0)	24,0(17,0-36,0)
		Staph	17,5(4,0-72,0)	17,5(8,0-27,0)	16,0(6,0-64,0)
		Total	21,0(4,0-72,0)	22,5(4,0-42,0)	24,0(6,0-64,0)
	Controle	Neg	27,0(9,0-56,0)	24,0(6,0-40,0)	32,0(15,0-49,0)
		Staph	21,0(4,0-54,0)	17,0(4,0-34,0)	15,5(2,0-48,0)
		Total	21,0(4,0-56,0)	22,0(4,0-40,0)	23,0(2,0-49,0)
Ganho de peso (KG)	Homeopatia		29,500±7,789		
	Controle		25,077±6,100		

Phytolaca decandra 6 CH

CONCLUSÃO

Observou-se que não houve influência das CCS, das frequências de PMNs e MNs do leite de ovinos com mastite subclínica, resultado que pode ter sido influenciado pela taxa de reinfecção dos animais. Concluiu-se que o tratamento homeopático foi eficiente no tocante à cura microbiológica de mastites subclínicas em ovinos. Além disso, o tratamento homeopático reduziu a taxa de reinfecção dos animais avaliados bem como permitiu incremento quanto ao ganho de peso nos filhotes das ovelhas tratadas com homeopatia.

REFERÊNCIAS

1. Pugh DG. Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca; 2005.
2. Bergonier D, Berthelot X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livest Prod Sci.* 2003;79:1-16.
3. Contreras A, Luengo C, Sánchez A, Corrales JC. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livest Prod Sci.* 2003;79:273-83.
4. Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco J, Paape MJ, et al. Mastitis in small ruminants. *Small Rumin Res.* 2007;68:145-53.
5. Contreras A, Miranda RE, Sánchez A, De La Fe C, Sierra D, Luengo C, et al. Presence of *Mycoplasma* species and somatic cell counts in bulk-tank goat milk. *Small Rumin Res.* 2008;75:247-51.
6. Leitner G, Chaffer M, Zamir S, Mor T, Glickman A. Udder disease etiology, milk somatic cell count and NAGase activity in Israeli Assaf sheep Throughout lactation. *Small Rumin Res.* 2001;39:107-12.
7. Gonzalo C, Ariznabarreta A, Carriedo JA, San Primitivo F. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and Milk yield losses in dairy ewes. *J Dairy Sci.* 2002;85:1460-7.
8. Costa NA, Mendonça CL, Afonso JAB, Sousa MI, Caslado AL, Pire JL, et al. Ocorrência de mastite em ovelhas atendidas na clínica de bovinos. In: Anais do 28o Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 2001; Salvador. Salvador: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária; 2001.p.123.
9. Mendonça CL, Afonso JAB, Costa NA. Mastite em ovelhas. *Vet Zootec CRMV- PE.* 2005;25:25-7.
10. Costa EO. Uso de antimicrobianos na mastite. In: Spinosa HS, Górnaiak SL, Bernardi MM. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.443-55.
11. Benites NR, Melville PA, Costa EO. Features and intensity of inflammatory response in bovine mammary glands. In: Proceedings of Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland; 2000; Stresa. Stresa: International Dairy Federation; 2000. p.30-5.
12. Hahnemann S. Exposição da Doutrina Homeopática ou Organon da Arte de Curar. 2a ed. São Paulo: GEHSP“Benoit Mure”; 1996.

13. Benites NR. Princípios gerais da homeopatia e Organon até o parágrafo 10. In: Anais do I Congresso Brasileiro de Homeopatia Veterinária; 2003; São Paulo. São Paulo: AMVHB; 2003.
14. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
15. Schalm OW, Noorlander DO. Experimental and observation leading to development of California Mastitis Test. J Am Vet Med Assoc. 1957;139:199-204.
16. Murray PR, Baron EJ, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology; 1999.
17. Bentley Instruments. Somacount 300: Operator's manual. Chaska: Bentley Instruments; 1995. p.12.
18. Ribeiro Filho A. Novo repertório de sintomas homeopáticos. São Paulo: Robe Editorial; 1996. p.723-69.
19. Graphpad InStat software. Statistical Analysis Systems for Personal Computers.1990-1993.
20. Larsgard AG, Vaabenoe A. Genetic and environment causes of variation in mastitis in sheep. Small Rumin Res. 1993;12:339-47.
21. Clements ACA, Taylor DJ, Fitzpatrick JL. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. J Dairy Res. 2003;70:139-48.
22. Batavani RA, Mortaz E, Falahian K, Dawoodi MA. Study on frequency, etiology and some enzymatic actives of subclinical ovine mastites in Urmia, Iran. Small Rumin Res. 2003;50:45-50.
23. Lafi SQ. Use of somatic cell counts and California mastitis tests results from udder halves milk samples to detect subclinical intramammary infections in Awassi sheep. Small Rumin Res. 2006;62:83-6.
24. Domingues PF, Lucheis SB, Serrão LS, Fernandes S, Contente APA, Martins ECV, et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa. Inês. Ars Vet. 2006;22:146-52.
25. Al-Majali AM, Jawabreh S. Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in southern Jordan. Small Rumin Res. 2003;47:243-8.
26. Coutinho DA, Costa JN, Ribeiro MG, Torres JA. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. Rev Bras Saude Prod Anim. 2006;7:139-51.
27. Blagitz MG, Batista CF, Souza FN, Benites NR, Melville PA, Strincagnolo CR, et al. Perfil celular e microbiológico do leite de ovelhas Santa Inês no período lactante e pós-desmame. Pesqui Vet Bras. 2008;28:417-22.

28. Bergonier D, Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res.* 2003;34:689-716.

Recebido em: 06/10/2014

Aceito em: 25/06/2015

ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Leptospira spp.* EM GATOS

Joyce Cappa Mittestainer¹

Alessandra Melchert²

José Francisco Antunes Ribeiro³

Raissa Saran Sartori⁴

Samea Fernandes Joaquim⁴

Katia Bresciani⁵

Helio Langoni⁶

RESUMO

A leptospirose destaca-se dentre as zoonoses de maior importância devido à sua ampla distribuição geográfica e por ter sua ocorrência favorecida principalmente em locais com climas tropicais e subtropicais, com altas temperaturas e índices pluviométricos elevados. Em felinos, a leptospirose é de ocorrência rara, não apresentando especificidade por reagirem com diferentes sorotipos de *Leptospira spp.* São considerados mais resistentes à infecção. Porém, já foi comprovada experimentalmente a ocorrência de leptospirose em gatos inoculados com a bactéria sem que ocorra a manifestação de sintomas. O objetivo do presente estudo foi pesquisar anticorpos anti-leptospíricos frente a diferentes sorovares de leptospirose pela prova de Soroaglutinação Microscópica em soros de 155 felinos domiciliados. Nenhuma das amostras avaliadas revelou soropositividade para os 13 sorovares avaliados.

Palavras-chave: felinos, leptospirose, aglutininas anti-leptospíricas, soroaglutinação microscópica.

SEROLOGICAL STUDY OF *LEPTOSPIRA SPP.* INFECTION IN CATS

ABSTRACT

Leptospirosis is pointed out between the most important zoonosis due to its wide geographic distribution and for having its occurrence favored in tropical and subtropical climates, with present high temperatures and rain indexes. In cats, leptospirosis is unusual, not present specificity because they react to different types of *Leptospira spp.* They are considered more resistent to the infection. However, was proved the occurrence of *Leptospira spp.* in the urine of cats experimentally inoculated with the bactéria with no clinical signs. The aim of this study was the research of antibodies face to different leptospira sorovars by the Agglutination Test in blood serum of 155 domestic cats. None of the evaluated samples showed serum positivity to the 13 tested sorovars.

Keywords: cats, leptospirosis, anti-leptospiral agglutinins, agglutination test.

¹ Médica Veterinária, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Animal, FMVZ-UNESP-Botucatu

² Profa. Ass. Dra. Clínica Médica de Pequenos Animais – FMVZ-UNESP- Botucatu

³ Médico Veterinário, Clínica Médica de Pequenos Animais - Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ-UNESP- Botucatu

⁴ Médica Veterinária Residente - Área Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ-UNESP- Botucatu

⁵ Profa. Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

⁶ Prof. Titular Área Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ-UNESP- Botucatu. Contato principal para correspondência

ESTUDIO SEROLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR LEPTOSPIRA SPP. EN GATOS

RESUMEN

La leptospira se destaca dentro de las zoonosis de mayor importancia debido a su amplia distribución geográfica y por tener su ocurrencia favorecida principalmente en localidades con climas tropicales y subtropicales, con altos índices pluviométricos y altas temperaturas. En felinos la leptospirosis es de ocurrencia rara, no se presenta especificidad por reacción con diferentes serotipos de *Leptospiraspp.* Son considerados más resistentes a la infección. Aunque ya fue comprobada experimentalmente la ocurrencia de leptospiruria en gatos inoculados con la bacteria sin manifestación de síntomas. El objetivo del presente estudio fue la búsqueda de anticuerpos frente a diferentes serovares de leptospirosis por la prueba de seroaglutinación microscópica en sueros de 155 felinos domésticos. Ninguna de las muestras analizadas reveló seropositividad para los 13 serovares analizados.

Palabras clave: felinos, leptospira, aglutinación antileptospira, seroaglutinación microscópica.

INTRODUÇÃO

O processo de urbanização e as mudanças ambientais, como as relacionadas ao clima, levam a um maior risco de contaminação ambiental e disseminação de doenças. Dentre as zoonoses a leptospirose destaca-se pela sua ampla distribuição geográfica, principalmente nas condições tropicais e subtropicais, pelas altas temperaturas e índices pluviométricos aumentados, principalmente em países em desenvolvimento, com condições precárias de saneamento básico e propensos às inundações.

A leptospirose é causada por diferentes sorovares de leptospirosis, e a infecção em humanos e em animais se dá pelo contato direto ou indireto com a urina contaminada de outros animais, ou pela penetração do agente a partir de membranas mucosas ou pela pele lesada, multiplicando-se no sangue e em órgãos-alvo como rins e fígado, podendo causar injúria renal e insuficiência hepática (1,2,3).

A leptospirose em felinos ocorre com menor frequência, sugerindo-se que sejam resistentes a essa doença, porém constituem potenciais fontes de infecção visto que podem excretar leptospirosis pela urina por mais de três meses após infecção experimental sem manifestar sintomas (4,5,6).

Larsson et al. (7), inocularam gatos pela via subcutânea com os sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola*, e não observaram alterações clínicas, mas detectaram aglutininas anti-leptospíricas 8 a 12 semanas após inoculação, e leptospirúria apenas nos animais inoculados com o sorovar *Canicola*, 2 a 4 semanas após inoculação. Foi realizada também a infecção experimental a partir da ingestão de ratos infectados e de seus órgãos, como rins e bexiga, não se evidenciando sinais clínicos, mas apenas leptospirúria em um dos animais 12 dias após o fornecimento das vísceras, e 15 dias após a ingestão dos ratos. Duas semanas após a infecção experimental todos os animais foram positivos à Seroaglutinação Microscópica, com detecção de IgM nos gatos alimentados com ratos ou vísceras, e IgG nos alimentados apenas com vísceras. Tal resultado mostra a ocorrência da infecção.

Langoni et al (8) avaliaram 200 amostras de soros de gatos atendidos no período de um ano em clínicas particulares e no Hospital Veterinário da FMVZ - Unesp Campus de Botucatu para verificar a presença de aglutininas anti-leptospíricas, encontrando 4,5% de resposta aos sorovares *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Copenhageni* e *Andamana*, com títulos variando de 100 a 400, concluindo pela baixa soroprevalência de anticorpos anti-leptospíricos nesta espécie.

Em estudo realizado em um hospital veterinário em Quebec, por Lapointe et al. (9), 40 amostras de sangue de gatos foram testadas para os sorovares *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Bratislava*, *Pomona*, *Autumnalis*, *Kirschneri* e *Grippytyphosa*, considerando como positivos títulos de anticorpos ≥ 100 UI e como potenciais casos clínicos títulos de anticorpos ≥ 200 UI. Nove animais foram soropositivos com título de 100 UI, e um com título de 200 UI, sendo que todos foram reagentes para o sorovar *Bratislava* e apenas um para o *Autumnalis*. A alta soropositividade obtida sugere que a doença possa ter maior importância clínica, e que gatos com leptospirose tendem a apresentar títulos mais baixos.

A pesquisa de Yanaguita et al. (10) com amostras de 200 soros felinos, em São Paulo, revelou 14,5% de positividade para diferentes sorovares de leptospirosas, sendo os mais frequentes: *Shermani*, *Pomona* e *Icterohaemorrhagiae*. Resultado de outro inquérito soroepidemiológico com 172 amostras de soro felino em São Paulo revelou 12,87% de positividade, com maior prevalência dos sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Pomona* (11).

Apesar da leptospirose felina ser relatada como de rara ocorrência (4), inquéritos sorológicos mostram reações positivas, como Santos et al. (12), que obtiveram 22,6% de positividade com animais reagentes para os sorovares *Pyrogenes*, *Bratislava* e *Autumnalis*. Verifica-se diferenças nos resultados sorológicos provavelmente de acordo com as regiões de procedência dos animais.

Devido à importância dos felinos como animais de estimação e por terem conquistado um maior espaço e estreitado a relação humano-animal, aumenta-se o risco de ocorrência de zoonoses no núcleo familiar, principalmente por poderem ser portadores assintomáticos de várias enfermidades, incluindo-se a leptospirose. (4,5,6)

Tendo em vista o aumento no atendimento de felinos em hospitais veterinários, o objetivo desse trabalho foi avaliar a soroprevalência de anticorpos anti *Leptospira spp.* pela utilização de sorologia realizada junto ao Núcleo de Pesquisas em Zoonoses – NUPEZO, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu, SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram escolhidas aleatoriamente 155 amostras de soro de gatos domiciliados atendidos no período de 01/04/2014 a 01/09/2014 no Hospital Veterinário da FMVZ - Unesp Campus de Botucatu (n = 100) e de Araçatuba (n = 55) para pesquisar a presença de aglutininas anti-leptospíricas. O sangue foi coletado por venopunção jugular e, após obtenção do soro, armazenado em microtubos estéreis de 1,5mL a -20°C até seu processamento.

Foi utilizado o teste de soroprecipitação microscópica-SAM, de acordo com o Ministério da Saúde (13). Inicialmente realizou teste de triagem frente à vários sorovares, e em caso de positividade as amostras soropositivas, seriam submetidas à titulação, considerando-se como reagentes aquelas com título igual ou superior a 100, segundo as normas do Ministério da Saúde. Foram utilizados sorovares mantidos em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (DIFCO Laboratories®, Detroit, USA), a 28°C, a saber: *Australis*, *Bratislava*, *Autumnalis*, *Canicola*, *Cynopteri*, *Djasiman*, *Grippytyphosa*, *Copenhageni*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Hardjo*, *NUP-01* pertencente ao sorogrupo *Canicola*, isolada no Núcleo de Pesquisa em Zoonoses – NUPEZO, a partir de urina canina.

Dos 155 animais testados, 86 eram machos (55,5%) e 69 fêmeas (44,5%) provenientes das cidades de Botucatu (n=73, 47,1%), Araçatuba (n=55, 35,5%), São Manuel (n=4, 2,5%), Bauru (n=3, 1,95%), Lençóis Paulista (n=3, 1,95%), São Paulo (n=2, 1,3%), Bofete (n=2, 1,3%), Avaré (n=1, 0,65%), Americana (n=1, 0,65%), Jumirim (n=1, 0,65%), Cerquilha (n=1, 0,65%), Macatuba (n=1, 0,65%), Promissão (n=1, 0,65%), Igarapu do Tietê (n=1, 0,65%), Porangaba (n=1, 0,65%), Quadra (n=1, 0,65%), Itatinga (n=1, 0,65%), Sorocaba (n=1,

0,65%), Conchas (n=1, 0,65%), Tatuí (n=1, 0,65%). Deste total, 143 (92,2%) eram mestiços, 6 (3,9%) eram persas e 6 (3,9%) eram siameses.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na prova de triagem os resultados para os diferentes sorovares testados foram negativos acarretando um novo re-teste para pesquisa de aglutininas anti-leptospíricas frente aos mesmos sorovares, cujos resultados mantiveram-se negativos.

Apesar de 100 amostras serem de casos de animais atendidos no HV de Botucatu, estes eram procedentes de uma grande área de abrangência, com animais de diferentes procedências, semelhantemente as 55 amostras procedentes de animais de Araçatuba. Os aspectos ambientais são importantes para a sobrevivência de leptospiras, considerando-se principalmente a temperatura e umidade. Ressalta-se que o número de animais é diferente de acordo com suas origens, mas de qualquer forma consideramos o resultado obtido no presente estudo incomum, comparando-se com os resultados de outros pesquisadores (6,7,8,9)

A análise dos resultados mostra que de fato os felinos são provavelmente mais resistentes à infecção leptospírica, quando se compara com outras espécies animais. Os gatos são considerados praticamente como refratários a leptospirose (4). Apesar da maior resistência desta espécie, não se deve descartar o papel desses animais na cadeia de transmissão da leptospirose na medida em que, quando a infecção ou doença ocorrem, há eliminação de leptospiras na urina (4, 7, 14, 15).

A ausência de resposta sorológica para os sorovares pesquisados pode ter ocorrido em função da resistência natural da espécie à infecção (4,5), entretanto, devem ser avaliadas as condições em que os animais eram criados e mantidos, pois em sua maioria trata-se de animais domiciliados e bem alimentados com ração comercial, de acordo com as informações dos proprietários no momento da coleta de sangue e do exame clínico. Apesar do hábito de carnivorismo, os mesmos provavelmente não consumiram roedores, evitando-se assim, fatores de risco para a infecção, pois sabe-se que roedores são potenciais reservatórios de leptospiras (16).

Outro aspecto que pode ser avaliado é o fato desses animais terem, possivelmente, menos contato com o ambiente externo, sujeito à contaminação por outras espécies animais, possíveis portadores renais, que contribuem para disseminação da infecção (17). Os gatos, apesar de seus hábitos instintivos de caça e exploratório, podem não ter entrado em contato com ambiente que favorece a manutenção de leptospiras. De fato, os animais eram, em sua maioria, procedentes da zona urbana central, e muitos deles residiam em apartamentos, diminuindo assim as chances de infecção pela menor exposição ao agente.

Frente aos resultados obtidos e pela importância da leptospirose como zoonose, e pela sua ampla distribuição, vê-se a necessidade de realização de novos estudos em que se correlacione os resultados sorológicos com a cultura de urina e/ou órgãos desses animais, para que se possa determinar a importância desta espécie na transmissão da doença para humanos e outros animais. A soroaglutinação microscópica é a prova padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde para pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira*, porém a correlação entre resultados sorológicos e pesquisa de DNA bacteriano em amostras de urina é bastante relevante, pois pode indicar o estado de portador renal e provável fonte de infecção com a eliminação do agente pela urina (2,4).

CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, tanto os animais atendidos nos hospitais veterinários da FMVZ de Botucatu quanto os animais domiciliados de Araçatuba foram negativos para os sorovares testados que, de acordo com a literatura são os mais frequentes na infecção

leptospírica nesta espécie. A despeito desses resultados, acredita-se ser importante associar a pesquisa sorológica à busca do agente por técnicas biomoleculares bem como pelo isolamento da bactéria em meios seletivos, a fim de evidenciar os portadores renais do agente.

REFERÊNCIAS

1. Neto GG. Frequência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em felídeos neotropicais em cativeiro no Brasil [dissertação]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2006.
2. Langoni H, Silva AV, Segismundo R, Lucheis SB, Paes AC. Variáveis epidemiológicas e alterações clínicas, hematológicas e urinárias em cães sororreagentes para *Leptospira* spp. Semina, Cienc Agrar. 2013;34(2):765-6.
3. Carlos ER, Kundin WD, Watten MD, Tsai CC, Irving GS, Carlos ET, et al. Leptospirosis in the Philippines: Felines studies. Am J Vet Res. 1971;32(9):1455-6.
4. Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 4th ed. Athens: Sauders; 2012.
5. Correa WM, Correa CNM. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. Porto Alegre: Medsi; 1992.
6. Adler B, Moctezuma LP. *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol. 2010;140(3-4):287-96.
7. Larsson CE, Santa-Rosa CA, Larsson MHMA, Birgel EH, Fernandes WR, Paim GV. Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. Int J Zoonoses. 1985;12(2):111-9.
8. Langoni H, Cabral KG, Kronfly CS. Pesquisa de aglutininas anti-leptospíricas em gatos. Clin Vet. 1998;3(17):24-6.
9. Lapointe C, Plamondon I, Dunn M. Feline Leptospirosis serosurvey from a Quebec referral hospital. Can Vet J. 2013;54(5):497-9.
10. Yanaguita RM, Santa-Rosa CA, Santos MAA, Ribeiro LOC. Inquérito sorológico para leptospirose em gatos de São Paulo. Arq Inst Biol. 1982;49(1-4):67-9.
11. Agunloye CA, Nash AS. Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. J Small Anim Pract. 1996;37(3):126-9.
12. Santos JP, Ferreira Júnior A, Mundim EV, Santos MP, Oliveira PR, Lima AMC. Pesquisa de Aglutininas anti-leptospíricas em gatos errantes da cidade de Uberlândia – MG. Vet Not. 2006;12(2):122.
13. Ministério da saúde. Manual de Leptospirose. Brasília: Fundação Nacional da Saúde; 1995.
14. Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. Climate change flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104(10):631-8.

15. Levett, PN. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? Clin Appl Immunol Rev. 2004;4:435-48.
16. Victoriano AFB, Smythie LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjanarat K, et al. Leptospirosis in the Asia Pacific region. BMC Infect Dis. 2009;9:147.
17. Ullmann LS, Langoni H. Interactions between environment, wild animals and human leptospirosis. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2011;17(2):119-29.

Recebido em: 07/11/2014

Aceito em: 25/06/2015

GONADOTROPIN RELEASING HORMONE (GnRH) AND EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN (eCG) IMPROVE THE PREGNANCY RATE ON PROTOCOLS FOR TIMED-ARTIFICIAL INSEMINATION IN BEEF CATTLE

Francisco Romano Gaievski¹
Graham Cliff Lamb²
Romildo Romualdo Weiss³
Melina Andreia Formighieri Bertol³
Marcio Saporski Segui¹
Ana Claudia Machinski Rangel Abreu¹
Luiz Ernandes Kozicki¹

ABSTRACT

The study aimed to verify the influence of GnRH and eCG in TAI protocols to improve the pregnancy rate (PR) in beef cattle, treated with previous intravaginal progesterone long-acting, in the breeding season 90 days. A total of 660 females were divided into five groups: (TAI1) injection of 1.0mg estradiol benzoate (EB) and P4 on d0, P4 removal and 0.075mg prostaglandin F2 α on d9, 1.0mg EB on d10, and TAI 32h (n = 120); (TAI2) same as TAI1, but inclusion of 500 μ g GnRH at TAI (n = 120); (TAI3) same as TAI1, but inclusion of 400IU eCG on d10 (n = 120); (TAI4) same as TAI3, but inclusion of 500 μ g GnRH at TAI (n = 120); (5) no estrus synchronization, but served by natural service (NS; n = 180). Forty-five days after the TAI, the TAI1, TAI2, TAI3, and TAI4 group were run with "clean-up" bulls for 45 d. Pregnancy was determined by ultrasonography on d45 for TAI PR and on d120 after TAI for all treatments for overall PR. There were no differences in PR among the four TAI protocols on d45 (cows: TAI1=48.0%, TAI2=53.8%, TAI3=57.6%, TAI4=58.3%; heifers: TAI1=53.3%, TAI2=57.1%, TAI3=57.1%, TAI4=56.2%). The PR after the 90-day breeding season was greater in all TAI groups of cows ($P < 0.0001$) compared with NS, except for heifers ($P > 0.05$). Cows and heifers were analyzed together, and no differences among groups were found. It was concluded that protocols for TAI using GnRH or eCG alone or together contribute significantly to improve the pregnancy rate in beef cattle females, when subjected to previous treatment with progesterone in the reproductive season.

Keywords: fixed-time artificial insemination, beef cattle, estrus synchronization, GnRH, eCG.

O FATOR LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (GnRH) E A GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG) MELHORA A TAXA DE PREENHIZ EM PROTOCOLOS PARA A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BOVINOS DE CORTE

RESUMO

O estudo teve como objetivo verificar a influência do GnRH e eCG em protocolos de IATF para melhorar a taxa de prenhez (TP) em bovinos de corte, tratados anteriormente com

¹ Master of Animal Science Program, School of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Pontifical Catholic University of Parana, Brazil

² North Florida Research and Education Center, University of Florida, Marianna, FL, USA

³ School of Veterinary Medicine, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil. Corresponding author: 055-41-3299-4329; kozicki.l@pucpr.br

progesterona intravaginal de ação prolongada, em estação de monta de 90 dias. Um total de 660 fêmeas foi dividido em cinco grupos: (TAI1) injeção de 1,0mg de benzoato de estradiol (BE) e P4 em d0, remoção de P4 e 0,075mg de prostaglandina F2a em d9, 1,0mg de BE no d10, e TAI 32h (n = 120); (TAI2) mesmo que TAI1, mas a inclusão de 500ug de GnRH em IA (n = 120); (TAI3) mesmo que TAI1, mas a inclusão de 400 UI de eCG no d10 (n = 120); (TAI4) mesmo que TAI3, mas a inclusão de 500ug de GnRH em IA (n = 120); (5) não sincronização do estro, mas servido por monta natural (MN, n = 180). Quarenta e cinco dias após a TAI, a TAI1, TAI2, TAI3 e grupo TAI4 foram deixados com os touros por 45 d. A prenhez foi determinada por ultrassonografia em d45 depois da TAI e em d120 após todos os tratamentos. Não houve diferenças na TP entre os quatro protocolos de TAI em d45 (vacas: TAI1 = 48,0%, TAI2 = 53,8%, TAI3 = 57,6%, TAI4 = 58,3%; novilhas: TAI1 = 53,3%, TAI2 = 57,1%, TAI3 = 57,1%, TAI4 = 56,2%). A TP, após a estação de monta de 90 dias foi maior em todos os grupos de vacas TAI ($P < 0,0001$) em comparação com MN, com exceção de novilhas ($P > 0,05$). As vacas e novilhas foram analisadas em conjunto, e não foram encontradas diferenças entre os grupos. Concluiu-se que os protocolos de TAI, utilizando GnRH ou eCG sozinho ou em conjunto, contribuem de forma significativa para melhorar a taxa de prenhez em fêmeas bovinas, quando submetidas a um tratamento prévio com progesterona na fase reprodutiva.

Palavras-chave: IATF, GnRH, eCG, sincronização de cio, gado de corte.

EL FACTOR LIBERADOR DE GONADOTROPINA (GNRH) Y LA GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (ECG) MEJORA DE LA TASA DE EMBARAZO EN PROTOCOLOS PARA LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EM TIEMPO FIJO EN GANADO DE CARNE

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo verificar la influencia de la GnRH y eCG en protocolos de IATF para mejorar la tasa de preñez (TP) en ganado para carne, previamente tratados con progesterona intravaginal una acción prolongada en la temporada de cría de 90 días. El total de 660 hembras fueron divididas en cinco grupos: (TAI1) inyección de 1,0 mg de benzoato de estradiol (BE) y P4 en día 0(d0), remoción de la P4 + 0,075 mg prostaglandina F2a en d9, 1,0 mg de EB en d10 y TAI 32h (n = 120); (TAI2) lo mismo TAI1, pero la inclusión de 500µg de GnRH en TAI (n = 120); (TAI3) lo mismo TAI1, pero la administración de 400 UI eCG en d10 (n = 120); (TAI4) lo mismo TAI3, pero la administration de 500µg de GnRH en TAI (n = 120); (5) sin la sincronización de celo, pero servida por monta natural (MN, n = 180). Cuarenta y cinco días después de la TAI, el TAI1, TAI2, TAI3, y el grupo TAI4 quedarán con los toros por 45 d. La gestación fue determinada por ultrasonografía en 45d después de TAI y en 120d después para todos los tratamientos. No hubo diferencias en TP entre los cuatro protocolos de TAI en d45 (vacas: TAI1 = 48,0%, TAI2 = 53,8%, TAI3 = 57,6% = TAI4 58,3%; vaquillas: TAI1 = 53,3%, TAI2 = 57,1%, TAI3 = 57,1% , TAI4 = 56,2%). El TP después de la temporada de cría de 90 días fue mayor en todos los grupos de vacas TAI ($P < 0,0001$) en comparación con MN, a excepción de las novillas ($p > 0,05$). Vacas y novillas fueran analizadas en conjunto, y no se encontraron diferencias entre los grupos. Se concluyó que el TAI usando protocolos de la GnRH o ECG solos o juntos, colaboran significativamente a mejorar la tasa de preñez en el ganado hembra cuando se somete a un tratamiento previo con la progesterona en la fase reproductiva.

Palabras clave: IATF, GnRH, eCG, sincronización de estros, bovino.

INTRODUCTION

Brazil's national cattle herd has recently been quantified at 209.5 million head (1). Among these, about 50% are females capable of reproduction. However, only 10% of these females are subjected to artificial insemination (AI) (2). Artificial insemination has contributed to improved genetics, hygiene, and reproduction control, but inaccurate observation of estrus (3) and lack of skilled labor (4) are limitations in this technique. Consequently, there has been significant economic interest in development of protocols involving hormonal synchronization of estrus and ovulation in beef cattle for fixed-time artificial insemination (TAI) without estrus observation (3).

To avoid the need for estrus detection in TAI, various hormonal protocols have been developed using combinations of progesterone (P4), estrogen, and prostaglandin F2alpha (PGF2 α) (5-8). Pregnancy rate did not differ with or without estrus detection (9).

To increase pregnancy rates, drugs (e.g., eCG and GnRH) and management techniques (e.g., interrupted temporary weaning) have been added to the conventional TAI protocols (10-13). Several studies investigating the usefulness of hormonal protocols in commercial beef cattle reported pregnancy rates of more than 50% in animals submitted to TAI (10,14), and TAI hormonal protocols followed by natural service in the breeding season resulted in an overall pregnancy rate of more than 80% (15,13,16).

Studies on bovines submitted to TAI protocols reported increased ovulation rates, indicating that P4 exposure improves ovarian activity (17). This becomes more relevant when there is a need for an annual female replacement rate of 20% (18).

Baruselli et al. (15) compared protocols based on P4, estrogen, and prostaglandin with protocols based only on GnRH or PGF2 α and found significantly superior pregnancy rates of 42.7% and 15.0%, respectively, in *Bos indicus* cows. The Ovsynch protocol based on GnRH and PGF2 α has not shown good reliability in Nelore cows, resulting in low pregnancy rate. We hypothesized that hormonal protocols for TAI using eCG at P4 removal or GnRH on the day of TAI would produce better pregnancy rates than protocols without the use of eCG or GnRH or the group with natural service. The present study aimed to verify the effects of GnRH and eCG in TAI protocols for improving the pregnancy rate (PR) in lactating beef cows and heifers, treated with previous intravaginal progesterone long-acting in 90-days breeding season.

MATERIALS AND METHODS

The present study used 660 animals (*B. indicus*, Nelore; *B. indicus* \times *B. taurus*, Simmental \times Nelore) and was conducted during the breeding season of 2011/2012. The study population included 387 lactating multiparous cows with suckling calves and 273 pubertal (presence of corpus luteum or follicles >8.0 mm diameter) heifers from a commercial herd. The cows were all within the 90-day (45–93 days) postpartum period and average values were as follows: age, 4.5 (3–5) years; parity, 3 (2–4) calvings; weight, 480 (450–550) kg; and body condition score (BCS), 6.0 (4.5–7.0) (1 = emaciated/9 = very fat). Average values for the heifers were as follows: age, 2.4 years (1.9–3.2); weight, 335 (290–350) kg; and BCS, 6.0 (4.0–7.0). The animals were kept on *Cynodum* sp. pasture plus mineral supplementation and water *ad libitum*. The animals were divided according to a 2 \times 2 factorial arrangement into 4 groups: TAI1, TAI2, TAI3, and TAI4 groups received different hormonal protocols (Figure 1) and TAI with frozen semen (19), and a natural service (NS) group remained with fertile bulls for 90 d. Animals in the TAI1, TAI2, TAI3, and TAI4 groups underwent pregnancy diagnosis on d45 before staying with the bulls for natural service for 45 days. Pregnancy diagnosis was

performed in all animals on d120 by using an ultrasound machine (D-Chison 600VET, 6-MHz linear transducer; China).

Protocols used in TAI 1, TAI2, TAI3, and TAI4 groups of cows and heifers.

TAI1 (n = 75 cows and 45 heifers)

P4+EB	-P4+PG	EB	+32 h TAI	US +NS	-NS
I	I	I	I	I	I
D0	D9	D10	D11	D45	D90

TAI2 (n = 78 cows and 42 heifers)

P4+EB	-P4+PG	EB	+32 h GnRH +TAI	US +NS	-NS
I	I	I	I	I	I
D0	D9	D10	D11	D45	D90

TAI3 (n = 78 cows and 42 heifers)

P4+EB	-P4+PG	EB +eCG	+32 h TAI	US+NS	-NS
I	I	I	I	I	I
D0	D9	D10	D11	D45	D90

TAI4 (n = 72 cows and 48 heifers)

P4+EB	-P4+PG	EB +eCG	+32 h GnRH +TAI	US+NS	-NS
I	I	I	I	I	I
D0	D9	D10	D11	D45	D90

NS (n=84 cows and 96 heifers)

NS					- NS
I					I
D0					D 90

Legend: P4: Intra vaginal device (0,558 g Progesteron = Cronipress, Biogenesis Bago); EB: (1 mg Estradiol Benzoate/mL. IM, Cronibest, Biogenesis Bago); PGF₂ α (0.075 mg / ml Cloprostenol = Croniben, Biogenesis Bago); eCG (400 IU Equine Chorionic Gonadotropin = Novohormon, Coopers); GnRH (500 μ g/mL Gonadorelin = Profertil, Tortuga, SP); NS = natural service.

STATISTICAL ANALYSIS

The data were analyzed using a statistical software program (20). The experimental data were analyzed as a 2 \times 2 factorial arrangement, and conception rate, eCG, and GnRH were considered as main effects. The differences in the postpartum period (DPP), weight, age, parity, and eCC among the treated groups of cows were analyzed by ANOVA (PROCTTEST procedure). The differences in the weight, age, and ECC among the heifer groups were analyzed by ANOVA (PROCTTEST procedure). The pregnancy rate data of the TAI for cows and heifers were analyzed by PROC FREQ of SAS. Cows and heifers were analyzed together to find differences using PROC FREQ of SAS. The model included main effects for CR, eCG, and GnRH and their respective interactions. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Results of pregnancy rate in multiparous and nulliparous animals are shown in Tables 1, 2, and 3. Table 3 shows the combined data of the cows and heifers analyzed within their respective groups. The DPP, weight, age, parity, and BCS before the beginning of the treatment did not differ among the groups. No interaction between TAI groups of cows ($P = 0.55$) and heifers ($P = 0.15$) was found.

Table 1. Pregnancy rate in multiparous cows (*Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus*) subjected to different hormonal protocols to fixed-time artificial insemination (TAI) and natural service (NS) in the breeding season of 2011/2012.

Group	Pregnancy rate		
	TAI (%)	TAI+45 days NS(%)	90 days of NS(%)
TAI1(n=75)	48.00 (36/75) ^a	84.00 (63/75) ^b	
TAI2(n=78)	53.84 (42/78) ^a	84.61(66/78) ^b	
TAI3(n=78)	57.69 (45/78) ^a	88.46 (69/78) ^b	
TAI4(n=72)	58.33(42/72) ^a	91.66 (66/72) ^b	
NS5(n=84)			57.14(48/84)

Different letters in the same rows or column are significantly different, $P < 0.0001$

Table 2. Pregnancy rate in nulliparous (*Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus*) subjected to different hormonal protocols to fixed-time artificial insemination (TAI) and natural service (NS) in the breeding season of 2011/2012.

Group	Pregnancy rate		
	TAI (%)	TAI + 45 days (%)	90 days of NS(%)
TAI1(n=45)	53.33 (24/45) ^a	86.66 (39/45) ^b	
TAI2(n=42)	57.14 (24/42) ^a	85.71 (36/42) ^b	
TAI3(n=42)	57.14 (24/42) ^a	92.85 (39/42) ^b	
TAI4(n=48)	56.25 (27/48) ^a	93.75 (45/48) ^b	
NS5(n=96)			84.37 (81/96)

Different letters in the same rows or column are significantly different, $P < 0.0001$

Table 3. Pregnancy rate in nulliparous and multiparous cows (*Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus*) subjected to different hormonal protocols to fixed-time artificial insemination (TAI) and natural service (NS) in the breeding season of 2011/2012.

Group	Pregnancy rate		
	TAI (%)	TAI+45 days NS(%)	90 days of NS(%)
TAI1(n=120)	50.0 (60/120) ^a	85.0 (102/120) ^b	
TAI2(n=120)	55.0 (66/120) ^a	85.0 (102/120) ^b	
TAI3(n=120)	57.5 (69/120) ^a	90.0 (108/120) ^b	
TAI4(n=120)	57.5(69/120) ^a	91.6(111/120) ^b	
NS5(n=180)			71.6 (129/180)

Different letters in the same rows or column are significantly different, $P < 0.0001$

The use of P4 intravaginal devices together with eCG or GnRH has been tested in *B. Indicus* (14, 21-27) and in *B. taurus* (28-33), with no consistent results. Overall, Brazilian data of TAI in beef cattle has shown a pregnancy rate of 49.6% (14).

Animals in groups TAI1, TAI2, TAI3, and TAI4 had pregnancy rates of 48.0%, 53.8%, 57.6%, and 58.3%, respectively (Table 1) ($P = 0.55$). Although there were no significant differences among the four groups ($P > 0.05$), TAI4 (eCG + GnRH) yielded a greater pregnancy rate (10.0% more) than TAI1. A 10% increase in pregnancy rate with the use of eCG and GnRH, in the same protocol, compared with the use of neither eCG nor GnRH is economically attractive.

Pregnancy rates for TAI vary and there is no consistent pattern among researchers. According to Ereno et al. (10) and Sá Filho et al. (26), the use of eCG or GnRH in TAI programs did not improve pregnancy rate in beef cows. Other studies, however, showed an increase (22,23,32,34). In our study, TAI using eCG or GnRH yielded pregnancy rates of 53.8%–57.6%, very close to those of Ereno et al. (10) (54.7%) and de Sá Filho et al. (7) (55.7%). Other authors state that eCG or GnRH administration with a progesterone-based protocol has advantages regarding ovulation and pregnancy rates (22,34).

Certain aspects have not been sufficiently clarified, such as timing of eCG or GnRH administration. Peres et al. (22) employed eCG 48 h, and Sa Filho et al. (24) 54 h and 32 h, after removal of P4, with no significant differences in results. Other variables, such as the administration of eCG earlier after P4 removal (22), anestrus cows (7), BCS (30,32), breed, diameter of the largest follicle (25), pre-synchronization (31), temporary weaning (10), and parity (30), should be considered for better results in TAI. In the present study, the TAI3 and TAI4 groups were treated with eCG on the day of P4 removal, and GnRH was injected in the TAI2 and TAI4 groups at 32 h after P4 removal following AI, and there were no differences in the pregnancy rate among the three groups.

Considering pregnancy rates after TAI followed by use of “clean-up” bulls (natural service) (Table 1), the difference between TAI1 and TAI4 (84.0% versus 91.6%) was less than when TAI was applied alone. However, when comparing pregnancy rates of any treated cows (TAI + 45 days NS) with those of cows that remained under the regime of natural service for 90 days, differences in favor of the TAI groups were strongly accentuated ($P < 0.0001$). This corroborates the results of Baruselli et al. (15), who reported the beneficial effects of TAI protocols with exposure of animals to P4 on induction of ovarian activity and synchronization of estrus in beef cows with TAI followed by natural service (35). In addition, no significant interaction was observed between GnRH and eCG for multiparous cows ($P = 0.55$), as well as for nulliparous animals ($P = 0.15$).

Regarding heifers submitted to TAI1, TAI2, TAI3, and TAI4, there was no significant difference among groups (Table 2). Further, there were no significant differences in pregnancy rate between groups treated with TAI + natural service and the group treated with natural service alone (NS5). This could lead to the misguided view that there is no benefit of TAI protocols in heifers. However, from a practical standpoint, the heifers submitted to TAI probably will calve earlier in the next breeding season. Azeredo et al. (35) reported that 82.0% of heifers submitted to TAI calved in the first 40 days of the next breeding season. As a result, heifers have increased postpartum rest in the next breeding season, parturitions can be timed according to nutritional availability, and herd health and management as well as marketing are improved. Time artificial insemination can also facilitate the use of breeds that would not be viable for natural service because of poor adaptability. Heifers submitted to TAI reached at least 53.3% pregnancy, and the products of these animals may have higher value because they are derived from genetically superior animals. The adoption of TAI in heifers is justified by a significantly superior pregnancy rate in the next breeding season (35). Analyzing the cow and heifer groups together yielded no difference between the protocols for

TAI (Table 3), but there was a difference among the treated groups and the NS alone indicating that exposure of animals to previous P4 can result in improved pregnancy rate.

CONCLUSIONS

In conclusion, protocols for TAI using GnRH or eCG alone or together improve significantly the pregnancy rate in beef cattle females, when subjected to previous progesterone treatment in the reproductive season.

REFERENCES

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. Municipal Livestock Production-2010 [cited 2015 Jan 19]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/economia/ppm/2010/default.shtm>.
2. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Report of the Brazilian Association of Artificial Insemination [Internet]. Uberaba; 2012 [cited 2015 Jan 19]. Available from: www.asbia.org.br.
3. Stevenson JS. Impact of reproductive technologies on dairy food production in the dairy industry. In: Lamb GC, Di Lorenzo N. Current and future reproductive technologies and world food production. New York: Springer; 2014. p.115-29.
4. Odde KG. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci.* 1990;68:817-30.
5. Ayres H, Martins CM, Ferreira RM, Mello JE, Dominguiza JH, Souza H, et al. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore (*Bos indicus*) cows treated with a progesterone-releasing intravaginal device. *Anim Reprod Sci.* 2008;109(1-4):77-87.
6. Pinheiro VG, Souza AF, Pergorer MF, Satrapa RA, Ereno RL, Trinca LA, et al. Effects of temporary calf removal and eCG on pregnancy rates to timed-insemination in progesterone-treated postpartum Nelore cows. *Theriogenology.* 2009;71(3):519-24.
7. Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Marques MO, Reis EL, Silva RCP, et al. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology.* 2010;73(5):651-8.
8. Silveira EF, Kozicki LE, Segui MS, Weiss RR, Santos IW, Bertol MAF. Comparison of long-term progesterone-based protocol on reproductive performance of prepubertal and pubertal beef heifers. *Arch Vet Sci.* 2014;19(1):1-6.
9. Borges LFK, Ferreira R, Siqueira LC, Boherer RC, Borstmann JW, Oliveira JFC, et al. Artificial insemination system without estrous observation in suckled beef cows. *Cienc Rural.* 2009;39(2):496-501.

10. Ereno RL, Barreiros TRR, Seneda MM, Baruselli PS, Pegorer MF, Barros CM. Pregnancy rate of lactating Nelore cows treated with progesterone associated with temporary calf removal or application of equine chorionic gonadotropin. *Rev Bras Zootec.* 2007;36(5):1288-94.
11. Meneghetti M, Sá Filho OG, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology.* 2009;72:179-89.
12. Pencai WF, Kozicki LE, Costa CEMP, Silva NL, Molleta JL, Motta JBO. Induction of estrus in postpartum crossbred cattle beef after use of different weaning protocols. *Vet Zootec.* 2011;45(1):53-62.
13. Gottschall CS, Almeida MR, Tolotti F, Magero J, Bittencourt HR, Mattos RC, et al. Evaluation of the reproductive performance of lactating beef cows subjected to FTAI from the application of GnRH, estrus manifestation, re-use of intravaginal devices and body condition. *Acta Sci Vet.* 2012;40(1):1-10.
14. Sá Filho OG, Meneghetti M, Peres RF, Lamb GC, Vasconcelos JL. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology.* 2009;72(2):210-8.
15. Baruselli PS, Marques MO, Carvalho NAT, Madureira EH, Campos Filho EP. Effect of different protocols for fixed-time artificial insemination on reproductive performance of lactating beef cows. *Rev Bras Reprod Anim.* 2002;26:218-21.
16. Demeterco D, Henry DD, Mercadante VRG, Lamb GC, Gaievski FR, Weiss B, et al. The effects of intramuscular or intravenous injections of gonadotropin releasing hormone at fixed-time artificial insemination on pregnancy rates of *bos indicus* beef cows. *Braz Arch Biol Technol.* 2014;57(3):361-6.
17. Nascimento AB, Souza AH, Guenther JN, Costa FP, Sartori R, Wiltbank MC. Effects of treatment with human chorionic gonadotrophin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. *Reprod Fertil Dev.* 2013;25(5):818-24.
18. Torres-Júnior JRS, Melo WO, Elias AKS, Rodrigues LS, Penteado L, Baruselli PS. Technique and economic considerations about assisted reproduction in beef cattle. *Rev Bras Reprod Anim.* 2009;33(1):53-8.
19. Brazilian College of Animal Reproduction. Manual for andrological exam and evaluation of animal semen. 2nd ed. Belo Horizonte: CBRA; 1998.
20. SAS Institute Inc. SAS software. Cary, NC, USA; 2003.
21. Dias CC, Wechsler FS, Day ML, Vasconcelos JL. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F(2alpha) treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. *Theriogenology.* 2009;72(3):378-85.

22. Peres RF, Claro Jr I, Sá Filho OG, Nogueira GP, Vasconcelos JL. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*. 2009;72(5):681-9.
23. Rossa LAF, Bertan CM, Almeida AB, Gaspar PS, Mazza PH, Binelli M, et al. Effect of eCG or estradiol benzoate associated to norgestomet on conception rate at inseminated postpartum beef cows. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2009;46(3):199-206.
24. Sá Filho MF, Torres-Júnio JR, Penteado L, Gimenes LU, Ferreira RM, Ayres H, et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci*. 2010b;118(2-4), 182-7.
25. Sá Filho MF, Crespilho AM, Santos JE, Perry GA, Baruselli PS. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci*. 2010c;120(1-4):23-30.
26. Sá Filho MF, Baldrighi JM, Sales JNS, Crepaldi GA, Carvalho JBP, Bo GA. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*. 2011;129(3-4):132-9.
27. Sales JN, Crepaldi GA, Girotto RW, Souza AH, Baruselli PS. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Anim Reprod Sci*. 2011;124(1-2):12-8.
28. Colazo MG, Bó GA, Illuminat H, Meglia G, Schmidt EE, Bartolomé J. Fixed-timed artificial insemination in beef cattle using CIDR-Bdevices, progesterone and estradiol benzoate. *Theriogenology*. 1999;51(1):404.
29. Cutaia L, Moreno D, Villata ML, Bó G. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. *Theriogenology*. 2001;55(1):408.
30. Mialot JP, Constant F, Dezaux P, Grimard B, Deletang F, Ponter AA. Estrus synchronization in beef cows: comparison between GnRH+PGF2alpha+GnRH and PRID+PGF2alpha+eCG. *Theriogenology*. 2003;60(2):319-30.
31. Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology*. 2009;71(4):698-706.
32. Souza AH, Viechnieski S, Lima FA, Silva FF, Araújo R, Bó GA, et al. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*. 2009;72(1):10-21.
33. Suplicy M, Suplicy Filho H, Kozicki LE, Breda JC, Weiss RR, Segui MS. Reduction of the interval calving-conception by use of hormonal protocols and fixed-time artificial insemination dairy cows. *Arch Vet Sci*. 2012;17(3):57-62.

34. Silva RCP, Rodrigues CA, Marques MO, Ayres H, Reis EL, Nichi M, et al. Effect of eCG and GnRH treatments in bos indicus cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Acta Sci Vet.* 2004;32:221.
35. Azeredo DM, Rocha DC, Jobim MIM, Mattos RC, Gregory RM. Estrous induction and synchronization in beef heifers and their effects on the pregnancy rate and at their performance on the second reproductive season. *Cienc Rural.* 2007;37(1):201-5.

Recebido em: 11/08/2014

Aceito em: 03/08/2015

Comitê de Avaliadores

Adelina Maria da Silva	Edviges Maristela Pituco	Luís Carlos Vulcano
Adriana Evangelista-Rodrigues	Eliana Curvelo	Luís Gustavo Corbellini
Ailton Vitor Pereira	Eliana Roxo	Luiz Alberto do Lago
Alan Maia Borges	Eunice Oba	Luiz Augusto do Amaral
Alessandro F. T. Amarante	Evelise Oliveira Telles	Luiz Celso Hygino da Cruz
Alexander Welker Biondo	Fabiano Montiani Ferreira	Luiz Ernani Henkes
Alexandre Oba	Felipe Masiero Salvani	Luiz Francisco Zafalon
Alexandre Vaz Pires	Fernanda da Cruz L. e Alvarenga	Luiz Henrique de Araújo Machado
Alice Maria Melville P. Della Libera	Fernando Antônio de Avila	Magda Alves de Medeiros
Alice Fernandes Alfieri	Fernando Ferreira	Marcelo Beltrão Molento
Alda Lúcia Gomes Monteiro	Fernando Pandolfo Bortolozzo	Marcelo George Mungai Chacur
Altivo José de Castro	Flávia de Rezende Eugênio	Marcelo Resende de Souza
Alvimar José da Costa	Francisco Carlos Faria Lobato	Marcelo Vasconcelos Meireles
Américo G. da Silva Sobrinho	Francisco Leydson Formiga Feitosa	Márcia C. da Sena Oliveira
Ana Carolina B. C. Fonseca Pinto	Frederico Ozanam Papa	Márcia Marinho
Ana Liz Garcia Alves	Geder Paulo Herrmann	Márcia Valéria Rizzo S. Szabó
Ana Paula Frederico R. L. Bracarense	Gilson Helio Toniollo	Marcia Oliveira Lopes
Ana Silvia A. M. T. Moura	Gustavo Ferrer Carneiro	Márcio Machado Ladeira
Ana Terezinha Tavechio	Helenice de Lima González	Marco A. F. Lopes
Andrey Pereira Lage	Helenice de Souza Spinosa	Marco Antonio Alvarenga
Andrigo Barboza de Nardi	Humberto Tonhati	Marco Antonio Lemos de Oliveira
Annelise de Souza Traldi	Iolanda Aparecida Nunes	Marconi Rodrigues de Farias
Antonio Carlos Cunha Lacreata Júnior	Ivan Roque de Barros Filho	Marcos Amaku
Antônio Carlos Paes	Ivo Wentz	Marcos Chalhoub Coelho Lima
Antonio João Scandolera	Jackson Victor de Araújo	Marcos Jun Watanabe
Antônio Sérgio Ferraud	Jane Megid	Marcos Veiga dos Santos
Antonio Waldir Cunha da Silva	Jean Carlos Ramos da Silva	Margareth Elide Genovez
Áureo Evangelista Santana	Jean Guilherme F. Joaquim	Maria Angélica Miglino
Bernardete Miranda dos Santos	Jener Alexandre S. Zuanon	Maria Cecília Rui Luvizotto
Bruna P. A. da Fonseca	João Carlos Pinheiro Ferreira	Maria de Lourdes R. S. da Cunha
Bruno Watanabe Minto	João Guilherme P. Filho	Maria Denise Lopes
Bruno Watanabe Minto	João Luiz Horácio Faccini	Maria Jaqueline Manprim
Caris Maroni Nunes	João Pessoa Araújo Júnior	Maria Lucia Gomes Lorenço
Carla Forte Maiolino Molento	João Ricardo Dittrich	Maria Lúcia Zaidan Dagli
Carla Lopes de Mendonça	José Antônio Viana	Maria Luiza Delavechia
Carlos Augusto A. Valadão	José Augusto B. Afonso	Maria Madalena Pessoa Guerra
Carlos Roberto Conti Naumann	José Carlos de Andrade Moura	Maria Terezinha S. Peraçoli
Carolina Madeira Lucci	José Carlos de Andrade Moura	Márcia Valéria Rizzo S. Szabó
Cassiano Victória	José Dantas Ribeiro Filho	Maria Verônica de Souza
Cecílio Soares Filho	José Domingos Guimarães	Marília Martins Melo
Célia Regina Orlandelli Carrer	José Fernando Machado Menten	Mary Marcondes
Celso A. Rodrigues	José Juradir Fagliari	Mauricio Costa Alves da Silva
Cezinande de Meira	José Laerte Nörnberg	Mayra Elena O. D'Avila
Ciniro Costa	José Nicolau Prospero Puoli Filho	Assumpção
Cláudia Valéria S. Brandão	José Paes de A. N. Pinto	Milton Hissashi Yamamura
Cláudio Dias Timm	José Paes de Oliveira Filho	Mônica Vicky Bahr Arias
Claudio Scapinello	José Roberto Kfoury Júnior	Nei Moreira
Daisy Pontes Netto	José Roberto Sartori	Nelson Carneiro Baião
Daniel Augusto Barroso Lessa	José Roberto Sartori	Nelson Moraes
Delphim da Graça Macoris	José Vasconcelos Lima Oliveira	Nereu Carlos Preste
Denise Botelho de O. Braga	Joselito Nunes Costa	Nilson Roberto Benites
Dilermando Miranda da Fonseca	Jovanir I. Müller Fernandes	Noeme Sousa Rocha
Dirlei Antônio Berto	Juliany Gomes Quitzan	Pacífico Antônio Diniz Belém
Domingos da Silva Leite	Julietta Rodini Engrácia de Moraes	Paulo Alberto Lovatto
Edson Ramos de Siqueira	Júlio César de Freitas	Paulo César Ciarlini
Eduardo Arruda T. Lanna	Kátia Denise Saraiwa Bresciani	Paulo Fernando Machado
Eduardo Bagagli	Laerte Ferreira	Paulo Francisco Domingues
Eduardo Francisquine Delgado	Lara Borges Keid	Paulo Henrique Franceschini
Eduardo Furtado Flores	Leandro Rodello	Paulo Henrique Jorge da Cunha
Eduardo Harry Birgel Júnior	Lílian Gregory	Paulo Michel Roeh
Eduardo Paulino da Costa	Lisiane de A. Martins	Paulo Roberto Brandão
	Lissandro Gonçalves Conceição	Paulo Roberto de Lima Meirelles
	Luciana Morganti Ferreira Maselli	Paulo Roberto Rodrigues Ramos
	Luciano José da Costa Figueiredo	

Peterson Triches Dornbusch
Priscilla Anne Melville
Raimundo Souza Lopes
Raphael Lúcio Andreatti Filho
Raquel Y. A. Baccarim
Raul Franzolin Neto
Regina Kiomi Takahira
Renato Cesar Sacchetto Tórres
Renato Silva de Sousa
Renée Laufer Amorim
Ricardo Augusto Mendonça Vieira
Ricardo de Oliveira Orsi
Ricardo J. Del Carlo
Roberta Lemos Freire
Roberto Calderón Gonçalves
Roberto de Oliveira Roça
Roberto Sartori Filho
Roberto Soares de Castro
Rodrigo Martins Soares
Rodrigo Otávio Silveira Silva
Rogério de Paula Lana
Rogério Giufrida
Rogério Martins Amorim
Ronaldo Lopes Oliveira
Rosana M. O. Clark
Rosângela Zacarias Machado
Rosangela Locatelli Dittrich
Rubens Antônio Carneiro
Sandra de Moraes Gimenes Bosco
Sandra Mara Araújo Crispim
Sebastião de Campos Valadares Filho
Sergio Borges Mano
Sheila Canavese Rahal
Sílvia M. Nishida
Simone Baldini Lucheis
Simone de Carvalho Balian
Simone Tostes de Oliveira
Sony Dimas Bicudo
Stefano Hagen
Stélio Pacca Loureiro Luna
Tereza Cristina C. da Silva
Tilde Rodrigues Froes
Valéria Marçal Félix de Lima
Valéria Nobre L. S. Oliva
Vamilton Alvares Santarém
Vanerli Beloti
Vania Maria de V. Machado
Venício José de Andrade
Vera Lúcia M. Hall
Victor Cruz Rodrigues
Virgínia Bodelão Richini Pereira
Wagner dos Reis
Wagner Luis Ferreira
William Koury Filho

REVISTA “VETERINÁRIA E ZOOTECNIA”

NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

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

2. Página com resumo, abstract e resumen

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

3. A estrutura do artigo deverá conter:

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

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

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

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

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

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

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

ARTIGOS DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, considerações finais e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

RELATOS DE CASO

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

COMUNICAÇÕES CURTAS

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

REFERÊNCIAS E CITAÇÕES

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

Exemplos

Citações

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referências

Indique até seis autores seguidos de et al.

1 Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococis em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

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

5 Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

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

6 Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos

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

7 Publicações disponíveis na Internet

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

JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE AND ANIMAL SCIENCE**RULES FOR PRESENTATION OF PAPERS**

The **Journal of Veterinary Medicine and Animal Science**, from School of Veterinary Medicine and Animal Science - UNESP, Botucatu, publishes original scientific and review papers, case reports and short communications related to Veterinary Medicine and Animal Science with semestral periodicity. The journal is open to national and/or foreign contributions (in English or Spanish) under the author's full responsibility.

Publication is conditioned to preliminary evaluation by the president of the editorial board, that analyses the merit and formal aspects of the work, according to the category of submitted paper and established editorial rules. If adequate, the article is subjected to review by two experts in the field. Opinion of reviewers are kept undisclosed. There are no possibility of identification of authors and reviewers. The articles not accepted will be returned to the authors.

Manuscripts must be submitted at the journal website <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>.

Prof. Helio Langoni

Revista "Veterinária e Zootecnia"

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS**SCIENTIFIC PAPERS**

Must be prepared according to the following items:

1. Title page:

- Title of the manuscript in Portuguese, English and Spanish, using Times New Roman font 12, simple spacing, bold and centered, with the words in upper case. When necessary, indicate the financial support as first footnote;

- Full authors names, where only the first letter of each name must be in upper case at the right side of the page. The authors' names must be typed separated by line, with numbered superscript **footnotes, which will indicate** the position and author's professional address, followed by the name of the institution where the work was done or to where it is linked;

- Name, address, telephone number, fax and e-mail address for correspondence;

- In case of involvement of human or experimental animals include the Ethics Committee approval or equivalent, and type before the bibliographic references with date of approval.

2. Abstract in Portuguese, English, and Spanish

- The "resumo", abstract and "resumen" must be followed by the title in the respective language and should not exceed 400 words each, with information regarding introduction, methods, results and conclusions. Text must be justified and in a single paragraph, simple spacing, beginning with the "RESUMO". Independent of the paper language, the abstract must be submitted in English, Portuguese and Spanish.

- Must include a maximum of five "palavras-chave", keywords, and palabras claves that identify the text content.

3. The structure of the paper must include:

Introduction: Clearly state the objective of the study with brief overview of the investigated problem and literature review.

Material and Methods: Provide a concise description of the experimental methods, variables, population in study, equipment, as well as the statistics, in sufficient detail to allow other researches to reproduce the results.

Results: The results should be described without interpretation and comparisons. The results may include **tables**, which should come in a separate sheet (maximum of 5 tables) and numbered consecutively in Arabic numerals, with the title on the top, according to the rules of table presentation by ABNT/WBR 6023/2000 from Associação Brasileira de Normas Técnicas, and identified in the text as Table; **figures**, in case of graphs, photographs, drawings, maps, etc, numbered consecutively in Arabic numerals (maximum of six), cited in the text as Figure. **Photographs** may be black and white or color, identified with the author's name in the back. **Original drawings** must be printed in high quality paper.

Discussion: Should be the interpretation of the results, relative to other relevant studies, presented in the introduction. If convenient, the results and discussion may be presented together.

Conclusions: The final synthesis, based on the results and discussion.

References: Should be presented according to Vancouver rules (<http://www.icmje.org/>), and arranged in alphabetical order, by author's last name (examples in the end of the instructions).

Manuscripts **should** be edited in Microsoft Word for Windows, for text, Excel (any version) for graphs, JPEG or GIF format (images) for photographs, drawings and maps, A4 format paper (21,0 x 29,7 cm), double spaced, leaving at least 2,5 cm margins, (lateral, top and bottom of page), Times New Roman font, size 12 and numbered in Arabic numerals, beginning in the identification page. The authors will have to present numeration in the lines, restarting the counting to each new page. Illustrations and legends must be presented on separate sheets.

Reprints will not be offered. The articles will be available in PDF format at the journal website. The same rules apply for all the other sections of the journal. The manuscripts should not exceed 15 pages. Unusual abbreviations should be used only after first time citation.

REVIEW ARTICLES

The review articles will be published in Portuguese, English or Spanish, if it provides scientific contribution that is relevant in the area, when invited by the editors. The review articles must include: Title (Portuguese, English and Spanish), resumo with palavras-chave, abstract with key words and resumen with palabras-claves, introduction, subject overview, conclusion e references. Must contain a maximum of 20 pages and 60 references.

CASE REPORTS

Should not be prepared with the same structure as the articles. The case reports must present the title in Portuguese, English and Spanish, resumo with palavras-chave, abstract with keywords and resumen with palabras claves and references. Must contain a maximum of five pages, three tables or figures and 15 references.

SHORT COMMUNICATIONS

These are reports with new and relevant data of original studies, as preliminary results of a research. Must be presented with a maximum of five pages, one table and ten references. The structure should follow the same rules for case reports.

REFERENCES AND CITATIONS

References should be numbered consecutively in order in which they are first mentioned in the text, tables, and legends by Arabic numbers in parentheses in same sequence. The titles of journals should be abbreviated according to the style *List of Journals Indexed in Index Medicus* available from: <http://www.nlm.nih.gov>.

Examples:

Citations

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram. O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51). O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

References

List the first six authors followed by et al.

1 Journal article

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organization as author

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Book

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Chapter in a book

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2^a ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

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

5 Conference paper

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

6 Dissertation

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

7 Electronic material on Internet

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

REVISTA “VETERINARIA Y ZOOTECCIA”

NORMAS PARA PRESENTACIÓN DE TRABAJOS

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

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

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

Prof. Helio Langoni

Revista “Veterinaria y Zootecnia”

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

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

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Deben ser estructurados de acuerdo con los siguientes puntos:

1. Página principal, con:

- Título del trabajo en portugués, inglés y en español, tipo de letra Times New Roman, número 12, con espacio entre líneas sencillo, en negrilla y centrado, en letra mayúscula. Cuando sea necesario, indicar la entidad que financia la investigación, como primer pie de página;
- Nombres completos de los autores, en los cuales solamente la primera letra de cada nombre debe ser mayúscula, en lado derecho de la página. Digitalarlos separados un por línea, con **notas de pie** de página numeradas y en sobrescrito, **que indicarán** el cargo y la dirección profesional de los autores, seguidos de la institución donde el trabajo fue realizado o en las cuales están vinculados;
- Nombre, dirección, teléfono, fax y correo electrónico para correspondencia.
- En el caso de involucrar seres humanos o animales de experimentación, enviar el concepto de la Comisión de Ética o equivalente, destacando en el trabajo antes de las referencias y fecha de aprobación, así como el envío de la copia del concepto.

2. Página con resumen en Portugués, Inglés y Español.

- Tanto el “resumo”, como el “abstract”, así como el resumen, deben estar seguidos del título del trabajo, en el idioma respectivo y contener, como máximo 400 palabras cada uno, con informaciones referentes a la introducción, metodología, resultados y conclusiones. El texto debe estar ajustado (justificado) y digitado en un solo párrafo y con espacio entre líneas sencillo iniciando por el “RESUMO”. El “Abstract”, y el Resumen, deben ser fiel traducción del “Resumo”. Independiente da la lengua que el artículo fue presentado deberá contener el resumen en portugués, inglés y español.

- Deben contener como máximo, cinco “palavras-chave” “keywords”, y palabras clave que identifiquen el contenido del texto.

3. La estructura del artículo deberá contener:

Introducción: debe ser clara, objetiva y relacionada al problema investigado, y a la literatura pertinente, así como con los objetivos de la investigación. La introducción establece los objetivos del trabajo.

Materiales y Métodos: debe ofrecer informaciones de reproductibilidad de la investigación, de forma clara y concisa, como variables, población, muestra, equipos, o métodos utilizados, inclusive los estadísticos.

Resultados: Presentación de los resultados obtenidos, que deben ser descritos, sin interpretaciones y comparaciones. Podrá ser bajo la **forma de tablas**, en hojas separadas, con máximo de cinco, ordenadas en algarismos arábigos, y encabezadas por el título, de acuerdo con las normas de presentación tabular de las normas ABNT/WBR 6023/2000 de la Asociación Brasileña de Normas Técnicas, ABNT, identificadas en el texto como Tabla; bajo la **forma de figuras** en los casos de gráficos, fotografías, dibujos, mapas, etc., ordenadas en algarismos arábigos hasta un máximo de seis, y citadas en el texto como Figura. **Fotografías** pueden ser en blanco y negro o a colores; identificadas con el nombre del autor o autores al lado opuesto. En el caso de **dibujos originales**, la impresión debe ser en papel adecuado, de calidad.

Discusión: Debe ser entendida como la interpretación de los resultados, confrontando la literatura pertinente, descrita en la introducción. De ser conveniente los resultados y discusión podrán ser presentados conjuntamente.

Conclusiones: Es la síntesis final, fundamentada en los resultados y en la discusión.

Referencias: Deben ser presentadas de acuerdo con las normas de Vancouver (<http://www.icmje.org/>), y el arreglo organización debe ser en orden alfabético por apellido del autor (modelos anexos al final).

Deberán ser editados en Microsoft Word for Windows, para edición de textos, Excel (cualquier versión) para gráficos, formato JPEG o GIF (imagen) para fotografías, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), a doble espacio, manteniendo márgenes de 2,5 cm, en las laterales, parte superior e inferior de cada página, fuente Times New Roman, número 12 y numeración consecutiva de las páginas en números arábigos, a partir de la hoja de identificación. Deberán presentar también la numeración en las líneas, recomenzando la cuenta a cada página nueva. Ilustraciones y leyendas deben ser presentadas en hojas separadas.

No se ofrecerán separatas. Los artículos estarán disponibles en el formato PDF en la página WEB de la revista. Para las demás secciones de la revista son válidas las normas anteriores. No deben exceder las 15 páginas. Abreviaturas no usuales, deben ser empleadas después de haber sido escritas por extenso en la primera utilización.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los artículos de la revisión bibliográfica serán publicados en los idiomas portugués, inglés y español, cuando el autor presente contribución científica, importante en el área específica del asunto abordado, y por invitación de los editores.

Deberán contener: Título (portugués, inglés y español), resumen con palavras-chave, abstract con keywords e resumen con palabras claves, introducción, desarrollo del tema, conclusión y referencias. Deberán contener como máximo 20 páginas y 60 referencias (citas bibliográficas).

ESTUDIOS DE CASO

No deben ser subdivididos, como para los artículos. Deben presentar el título en portugués, en inglés y español, resumen con palavras-chave, abstract con key words e resumen con palabras-claves y referencias. Deben contener como máximo cinco páginas, tres tablas o figuras y 15 referencias bibliográficas.

COMUNICACIONES CORTAS

Son relatos con datos inéditos y relevantes de estudios originales, como por ejemplo resultados preliminares de una investigación. Deben ser presentados como máximo en cinco páginas, una tabla y 10 referencias bibliográficas. La estructuración debe respetar las normas para estudios de caso.

REFERENCIAS E CITACIONES

Numerar las referencias consecutivamente según el orden en que se mencionen por primera vez en el texto. En éste, en los cuadros y leyendas, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Abreviar los títulos de las revistas según *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponible en: <http://www.nlm.nih.gov>.

Ejemplos

Citations

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referencias

Mencionan los seis primeros autores seguidos de la abreviatura et al.

1 Artículo de periódico

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Freqüência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organización como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Libro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Capítulo en libro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

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

5 Ponencias o conferencias en simposio, congreso, reuniones, etc .

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

6 Tesis

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

7 Medios electrónicos en Internet

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