

Veterinária e Zootecnia

Vet e Zootec.

2014 março; 21(1): 001-207

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. 21, n.1, mar. (2014)
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
2014

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 e Wellington Ricardo Guerra.

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

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

Secretaria: Apoio STAEPE – Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão

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

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

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

Prof. Dr. Helio Langoni

Revista “Veterinária e Zootecnia”

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu

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

Corpo Editorial

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

SUMÁRIO/CONTENTS/SUMARIO

EDITORIAL	8
ARTIGOS DE REVISÃO/REVIEW ARTICLES/ARTÍCULOS DE REVISIÓN	
PRINCIPAIS ZONÓSES EM MAMÍFEROS SELVAGENS/ PRINCIPAL ZONÓSES IN WILD MAMMALS/ PRINCIPALES ZONOSIS EN MAMÍFEROS SALVAJES. Felipe Fornazari, Helio Langoni	10
LINFADENITE SUÍNA POR <i>Rhodococcus equi</i>: ASPECTOS GERAIS DA AFECCÇÃO, VIRULÊNCIA DAS LINHAGENS EM SUÍNOS E HUMANOS/ LYMPHADENITIS SWINE BY <i>Rhodococcus equi</i>: GENERAL ASPECTS OF AFECCÇÃO, VIRULENCE OF THE STRAINS IN SWINE AND HUMANS/ LINFADENITIS PORCINA POR <i>Rhodococcus equi</i>: ASPECTOS GENERALES DE AFECCIÓN, LA VIRULENCIA DE LAS CEPAS EN CERDOS Y SERES HUMANOS. Gustavo Henrique Batista Lara, Márcio Garcia Ribeiro	25
ARTROPLASTIA TOTAL NÃO CIMENTADA DA ARTICULAÇÃO COXOFEMORAL EM CÃES/ CEMENTLESS TOTAL HIP ARTHROPLASTY IN DOGS/ ARTROPLASTIA TOTAL COXOFEMORAL NO CEMENTADA EN PERROS. Lucia M. Izique Diogo, Bruno Watanabe Minto, Cláudia Valéria Seullner Brandão.....	39
CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO PÓS-PARTO EM BOVINOS/ CONSIDERATIONS ABOUT THE POSTPARTUM IN CATTLE/ CONSIDERACIONES SOBRE EL PERÍODO DESPUÉS DEL PARTO EN EL GANADO. Carolina Nogueira de Moraes, Leandro Maia, Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga, Eunice Oba.....	53
SEPSE EM FELINOS/ SEPSIS IN CATS/ SEPSIS EN FELINOS. Fernanda Chicharo Chacar, Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães-Okamoto, Alessandra Melchert, Vanesa Kutz de Arruda, Daniel Diola Bento, Denis Carvalho Costa	64
RELATOS DE CASO/CASE REPORTS/ESTUDIOS DE CASO	
DESMOTOMIA DO ACESSÓRIO DO TENDÃO FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL NO TRATAMENTO DAS TENDINITES RECIDIVANTES EM EQUINOS: RELATO DE TRÊS CASOS/ SUPERIOR CHECK LIGAMENT DESMOTOMY FOR TREATMENT OF RECURRENCE OF SUPERFICIAL DIGITAL FLEXOR TENDONITIS IN HORSES: THREE CASES REPORT/ DESMOTOMÍA DEL LIGAMENTO ACCESÓRIO DEL TENDÓN FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL COMO TRATAMIENTO DE RECURRENCIA DE LAS TENDINITIS EN EQUINOS: REPORTE DE TRES CASOS. Pierre Barnabé Escodro, Carlos Alberto Hussni.....	77
ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOTERAPIA INTRAVESICAL E QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA NO TRATAMENTO DE CARCINOMA UROTELIAL EM VESÍCULA URINÁRIA DE CÃO / ASSOCIATION BETWEEN INTRAVESICAL IMMUNOTHERAPY AND ANTINEOPLASTIC CHEMOTHERAPY IN TREATMENT OF THE UROTHELIAL CARCINOMA OF THE URINARY BLADDER IN DOG/ ASOCIACIÓN ENTRE INMUNOTERAPIA INTRAVESICAL Y QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA EN TRATAMIENTO DEL CARCINOMA UROTELIAL DE VEJIGA URINARIA EN PERRO. Talita Mariana Morata Raposo, Giovanna Rossi Varallo, Rosana da Cruz Lino Salvador, Erika Maria Terra, Mirela Tinucci Costa, Carlos Roberto Daleck, Andriago Barboza de Nardi	82
CRANIOTHORACOPAGUS EM SUÍNO: RELATO DE CASO/ CRANIOTHORACOPAGUS IN SWINE: A CASE REPORT/ CRANIOTHORACOPAGUS EN PORCINO: REPORTE DE UN CASO. Teresa de Jesús Oviedo Socarrás, Nubia Braga Pereira, Misael Enrique Oviedo Pastrana	87

CESAREAN SECTIONS IN MARMOSETS: WHITE-TUFTED MARMOSET (*Callithrix jacchus*)/ CESAREANA EM SAGUIS: SAGUI-DE-TUFOS-BRANCOS (*Callithrix jacchus*)/ CESÁREA EN TITÍES: TITÍES-DE-MECHONES-BLANCOS (*Callithrix jacchus*). Nereu Carlos Prestes, João Carlos Pinheiro Ferreira, Myrna Campos Ferraz, Natache Arouca Garofalo, Carla Regina Barbieri Simões, Fabiane Aparecida Sabino, Luciana Silva Leal, Eunice Oba92

COMUNICAÇÃO CURTA/SHORT COMMUNICATION/COMUNICACIÓN CURTA

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E MULTIRRESISTÊNCIA BACTERIANA IN VITRO DE OTITE EXTERNA DE CÃES – COMUNICAÇÃO CURTA MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS AND BACTERIAL MULTIRESTANCE IN VITRO OF EXTERNAL OTITIS OF DOGS - SHORT COMMUNICATION/ DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO Y RESISTENCIA MULTIDROGA BACTERIANA IN VITRO DE LA OTITIS EXTERNA EN PERROS – COMUNICACIÓN CORTA. Leopoldo Augusto Moraes, Jessica Marisa Mendes Pereira, Sandro Patroca Silva, Vânia Maria Trajano da Silva Moreira, Alexandre do Rosário Casseb98

DIGESTIBILIDADE IN SITU DO SORGO E DESAPARECIMENTO DO NITROGÊNIO AMONIACAL EM VACAS HOLANDESAS ALIMENTADAS COM ZEÓLITA E URÉIA/ IN SITU DIGESTIBILITY OF SORGHUM AND DISAPPEARANCE OF AMMONIA NITROGEN IN HOLSTEIN COWS FED WITH UREA AND ZEOLITE/ LA DIGESTIBILIDAD IN SITU DE SORGO Y DESAPARICIÓN DE NITRÓGENO AMONIACAL EN VACAS HOLANDESAS ALIMENTADAS CON UREA Y ZEOLITA. Felipe Azevedo Ribeiro, Jozivaldo Prudêncio Gomes de Morais, Rodrigo Donizeti Cardoso, Gilberto Batista de Souza, Sérgio Novita Esteves, Alberto Carlos de Campos Bernardi102

ARTIGOS/ARTICLES/ARTÍCULOS

SISTEMÁTICA DE VIGILÂNCIA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU/SP / SISTEMATIC MONITORING FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN THE CITY OF BOTUCATU/SP / EL SEGUIMIENTO SISTEMÁTICO DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA EN BOTUCATU/SP. Carla Janeiro Coiro, Mariana Vincenzi, Ana Paula Lopes Corrêa, Felipe de Freitas Guimarães, Helio Langoni.....108

COMPORTAMENTO INGESTIVO DE CORDEIROS EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO EM PASTAGEM DE AZEVÉM/ INGESTIVE BEHAVIOR OF LAMBS IN PRODUCTION SYSTEMS ON ITALIAN RYEGRASS/ COMPORTAMIENTO INGESTIVO DE CORDEROS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN PASTO DE RAIGRÁS. Ticiany Maria Dias Ribeiro, Alda Lúcia Gomes Monteiro, Hugo von Linsingen Piazzetta, Paulo César de Faccio Carvalho, Marina Gabriela Berchiol da Silva, Cláudio José Araujo da Silva, Andressa Santanna Natel, Damaris Ferreira de Souza, Paulo Roberto de Lima Meirelles117

A SUBSTITUIÇÃO DO MEIO TCM PELO MEIO BARC, SUPLEMENTADO COM SFB, BSA OU PVA, PARA A MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS IN VITRO, NÃO INCREMENTA A SUBSEQUENTE PRODUÇÃO DE BLASTOCISTOS / REPLACING TCM WITH BARC MEDIUM SUPPLEMENTED WITH FCS, BSA OR PVA FOR IN VITRO OOCYTE MATURATION DID NOT SUPPORT SUBSEQUENT BLASTOCYST PRODUCTION/ SUSTITUCIÓN DE TCM POR BARC, ENRIQUECIDO CON SFB, BSA O PVA, PARA LA MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS IN VITRO NO INCREMENTA LA PRODUCCIÓN POSTERIOR DE BLASTOCISTOS. Jéssica de Oliveira Caldeira, Diego Gouvêa de Souza, Renata Sanches Calegari, Daniela Martins Paschoal, José Mateus Sudano, Alicia Martins Júnior.....127

INFECCÃO POR *Trypanosoma cruzi* EM ANIMAIS SILVESTRES PROCEDENTES DE ZOOLOGICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO/ *Trypanosoma cruzi* INFECTION IN ZOO WILD ANIMALS FROM SAO PAULO STATE, BRAZIL/ INFECCION POR *Trypanosoma cruzi* EN ANIMALES SILVESTRES DE ZOOLOGICOS DE SAO PAULO, BRASIL. Carolina Ballarin Zetun, Simone Baldini Lucheis, Marcella Zampoli Troncarelli, Helio Langoni.....139

- UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES PERÍODOS DE FOTOESTIMULAÇÃO EM ÉGUAS ACÍCLICAS PARA O CONTROLE DA SAZONALIDADE REPRODUTIVA/ USE OF DIFFERENT PERIODS OF PHOTOSTIMULATION IN ACYCLIC MARES FOR REPRODUCTIVE SEASONAL CONTROL/ UTILIZACIÓN DE DIFERENTES PERIODOS DE FOTOESTIMULACIÓN EN YEGUAS ACÍCLICAS PARA EL CONTROL DE LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA.** Carlos Guilherme de Castro Schutzer, Hélène Lacerda de Resende, José Carlos de Figueiredo Pantoja, Marco Antônio Alvarenga148
- SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO POR HELMINTOS GASTRINTESTINAIS EM BOVINOS LEITEIROS DA MESORREGIÃO DO SUDOESTE PARANAENSE, BRASIL/ DAIRY CATTLE SUSCEPTIBLY TO GASTROINTESTINAL HELMINTH INFECTION IN THE MIDDLE REGION OF THE SOUTHWEST OF PARANA, BRAZIL/ SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR HELMINTOS GASTROINTESTINALES EN BOVINOS LECHEROS DE LA MESOREGIÓN DEL SUDOESTE PARANAENSE, BRASIL.** Claudia Mello Ribeiro, Aristeu Vieira Da Silva, Dirion Pinzon, Paulo Cesar Cassol, Emanuel Pizzi, Tiago Ribeiro Machado, Satie Katagiri.....154
- EFICÁCIA “IN VIVO” DA CEFOPERAZONA SÓDICA, GENTAMICINA E CIPROFLOXACINO NO TRATAMENTO INTRAMAMÁRIO DA MASTITE CLÍNICA BOVINA/ IN VIVO EFFICACY OF SODIUM CEFOPERAZONE, GENTAMICIN AND CIPROFLOXACIN FOR THE INTRAMAMMARY TREATMENT OF CLINICAL MASTITIS IN COWS/ EFICACIA IN VIVO DE LA CEFOPERAZONA SÓDICA, LA GENTAMICINA Y EL CIPROFLOXACINO EN EL TRATAMIENTO INTRAMAMARIO DE LA MASTITIS CLÍNICA BOVINA.** Sérgio Ricardo Maiolino, Márcio Garcia Ribeiro, Rodrigo Garcia Motta, Aristeu Vieira da Silva, Glaucea Suman Maiolino, Fernando José Listoni160
- EFICÁCIA TERAPÊUTICA E RESIDUAL DE SEIS FORMULAÇÕES INSETICIDAS SOBRE O PARASITISMO POR LARVAS DE *Dermatobia hominis* EM BOVINOS/ THERAPEUTIC AND PROTECTIVE EFFICACY OF SIX PARASITICIDES IN CONTROLLING *Dermatobia hominis* INFESTATION IN CATTLE/ EFICACIA TERAPÉUTICA Y RESIDUAL DE SEIS FORMULACIONES INSECTICIDAS SOBRE LA INFESTACIÓN DE *Dermatobia hominis* EN GANADO.** Teresa Cristina Goulart Oliveira-Sequeira, Rogério Martins Amorim, Alexandre Secorun Borges, Milena Palmeira Reis Brant177
- COMPARAÇÃO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO DE SÊMEN REFRIGERADO DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR E QUARTO DE MILHA/ COMPARISON OF DIFFERENCES STORAGE TEMPERATURES IN COOLING SEMEN OF MANGALARGA MARCHADOR AND QUARTER HORSES STALLIONS / COMPARACIÓN DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO DE SEMEN REFRIGERADO DE CABALLOS MANGALARGA MARCHADOR Y CUARTO DE MILLA.** Marcel Cavalcanti Farrás, Eduardo Gorzoni Fioratti, Carlos Ramires Neto, Marcio Teoro do Carmo, Rogério Antônio de Oliveira, Frederico Ozanan Papa, José Nicolau Próspero Puoli Filho, Marco Antônio Alvarenga.....187

EDITORIAL

PREOCUPAÇÃO MUNDIAL: BEM-ESTAR ANIMAL

A sociedade, em destaque os consumidores de maneira geral, tem fomentado discussões sobre a temática que, já há alguns anos, é a tônica de países desenvolvidos e tem propiciado mudanças no sistema produtivo. O ministério da Agricultura tem buscado adaptar situações do dia-a-dia no processo produtivo, adequando práticas visando os conceitos de humanização.

De acordo com pesquisadores da área, o bem-estar deve se relacionar com várias necessidades como a liberdade, felicidade, adaptação, controle, capacidade de previsão, sentimentos, sofrimento, dor, ansiedade, medo, tédio, estresse e saúde. Na realidade, trata-se de uma ciência indispensável aos profissionais envolvidos com a interação entre humanos e animais. Por meio de publicações, os Conselhos Regionais e Federal de Medicina Veterinária vem valorizando o tema e este último já criou a Comissão de Ética e Bem-estar Animal (Cebea).

De acordo com o Ministério da Educação e Cultura, a sociedade espera do profissional médico veterinário o seu comprometimento com a saúde e bem-estar animal. Entendemos que este conceito deve ser estendido da mesma forma para o zootecnista que também está envolvido com a produção de animais de interesse zootécnico e, portanto, é imprescindível a prática do bem-estar animal no processo produtivo das mais diferentes espécies de animais de produção. Apesar da ciência do bem-estar animal ter um histórico de décadas em alguns países, no Brasil o assunto tem despertado o interesse e fomentado discussões, pois há uma exigência principalmente da União Europeia com a criação de barreiras levando a uma perda de espaço no mercado de exportação, o que tem exigido de muitos produtores uma adaptação no processo produtivo. Este é um tema relevante e, indubitavelmente, deverá ser respeitado e aplicado na criação de animais tanto estimulação quanto de produção. No entanto, é considerado desafiador e uma missão complexa.

Este número da Revista traz artigos inéditos interessantes, contribuindo com o desenvolvimento científico em diferentes áreas do conhecimento. Como artigos de revisão: Principais zoonoses em mamíferos selvagens; Linfadenite suína por *Rhodococcus equi*: aspectos gerais da afecção, virulência das linhagens em suínos e humanos; Artroplastia total não cimentada da articulação coxofemoral em cães; Considerações a respeito do pós-parto em bovinos; Sepses em felinos. Os relatos de caso: Desmotomia do acessório do tendão flexor digital superficial no tratamento das tendinites recidivantes em equinos: relato de três casos; Associação entre a imunoterapia intravesical e quimioterapia antineoplásica no tratamento de carcinoma urotelial em vesícula urinária de cão; Craniothoracopagus em suíno: relato de caso; Cesarean sections in marmosets: white-tufted marmoset (*Callithrix jacchus*). Comunicações curtas: Diagnóstico microbiológico e multirresistência bacteriana in vitro de otite externa de cães – comunicação curta; Digestibilidade in situ do sorgo e desaparecimento do nitrogênio amoniacal em vacas holandesas alimentadas com zeólita e uréia. Artigos originais: Sistemática de vigilância para leishmaniose visceral canina no município de Botucatu-SP; Comportamento ingestivo de cordeiros em sistemas de produção em pastagem de azevém; A substituição do meio tcm pelo meio barc, suplementado com sfb, bsa ou pva, para a maturação de oócitos bovinos in vitro, não incrementa a subsequente produção de blastocistos; Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres procedentes de zoológicos do estado de São Paulo; Utilização de diferentes períodos de fotoestimulação em

éguas acíclicas para o controle da sazonalidade reprodutiva; Susceptibilidade à infecção por helmintos gastrintestinais em bovinos leiteiros da mesorregião do sudoeste paranaense, Brasil; Eficácia “in vivo” da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário da mastite clínica bovina; Eficácia terapêutica e residual de seis formulações inseticidas sobre o parasitismo por larvas de dermatobia hominis em bovinos; Comparação de diferentes temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado de garanhões da raça mangalarga marchador e quarto de milha;

Prof. Helio Langoni
Editor-Chefe

PRINCIPAIS ZONOSSES EM MAMÍFEROS SELVAGENS

Felipe Fornazari¹
Helio Langoni¹

RESUMO

O estudo das zoonoses que ocorrem em animais selvagens é importante no contexto de saúde pública, animal e ambiental. O presente trabalho teve como objetivo revisar algumas das principais zoonoses em mamíferos selvagens, especialmente no Brasil. A toxoplasmose possui grande importância em primatas neotropicais e marsupiais australianos, sendo fatal nesses casos. A prevenção consiste em higiene dos recintos, destino adequado às fezes dos felídeos e congelar a carne previamente antes de fornecer aos animais. Cuidados especiais devem ser tomados com espécies que pertencem aos grupos de risco. Os quirópteros são os principais reservatórios selvagens da raiva. Espécies da ordem Carnívora também possuem importância em algumas regiões, como América do Norte, Europa e nordeste do Brasil. A utilização de vacinas em carnívoros selvagens terrestres de vida livre tem se mostrado eficaz, e sua implementação no Brasil poderia reduzir os casos de raiva, assim como tem ocorrido em outros países. As leishmanioses tem se mostrado como um grande problema de saúde pública e, nos últimos anos, uma ameaça à conservação de algumas espécies mantidas em cativeiro, como canídeos e primatas, quando as mesmas encontram-se em áreas endêmicas para leishmaniose visceral. As medidas de prevenção atualmente adotadas são consideradas pouco eficazes, e o uso de coleiras antiparasitárias em canídeos selvagens cativos tem sido recomendado. As informações sobre a leptospirose são escassas em animais selvagens no Brasil. A infecção está presente nos animais de vida livre, assim como nos animais mantidos nos maiores zoológicos do país. No entanto, seu papel como fontes de infecção, bem como o impacto da leptospirose nos animais selvagens, ainda é desconhecido. As zoonoses discutidas podem representar um risco à saúde pública, especialmente no caso da raiva na América, Europa e África. A saúde animal consiste em um aspecto importante em alguns casos, como da leishmaniose e da toxoplasmose, uma vez que determinadas espécies podem desenvolver lesões graves e vir a óbito quando acometidas por estas enfermidades.

Palavras-chave: zoonoses, animais selvagens, toxoplasmose, raiva, leishmaniose, leptospirose

PRINCIPAL ZONOSSES IN WILD MAMMALS

ABSTRACT

The study of zoonoses that occurs in wild animals is important in public, animal and environmental health issues. The present study had the objective to revise some of the main zoonoses in wild mammals, especially in Brazil. Toxoplasmosis has great importance in Neotropical primates and Australian marsupials, being fatal in such cases. Prevention consists in hygiene of the enclosures, adequate destiny of cat feces and freeze meat previously before feeding the animals. Especial care should be taken with species that belong to risk groups. Bats are the main wild reservoir of rabies. Species of Carnívora order has also importance in some regions, such as North America, Europe and northeast of Brazil. The use of vaccines in free-ranging terrestrial wild carnivores has showed to be efficient, and its implementation in

¹ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Área de Medicina Veterinária Preventiva, FMVZ – UNESP/Botucatu – SP. Correspondência para, hlangoni@fmvz.unesp.br

Brazil could reduce rabies cases, as has occurred in other countries. Leishmaniasis has been a great public health problem and, in the last years, a threat to conservation of captive species, such as wild canids and primates, when they are located in endemic areas for visceral leishmaniasis. Preventive measures adopted today are considered poorly efficient, and the use of anti-parasitic collars in captive wild canids has been recommended. Information regarding leptospirosis in wild animals is scarce in Brazil. The infection is present in free-ranging animals, as well as in animals kept in large zoos of the country. However, their role as source of infection, as well as the impact of leptospirosis in wild animals, is still unknown. The discussed zoonoses can represent a risk to public health, especially in the case of rabies in the America, Europe and Africa. Animal health consists in an important aspect in some cases, like leishmaniasis and toxoplasmosis, once some species can develop severe lesions and come to obit when affected by these diseases.

Keywords: zoonosis, wild animals, toxoplasmosis, rabies, leishmaniasis, leptospirosis

PRINCIPALES ZONOSIS EN MAMÍFEROS SALVAJES

RESUMEN

El estudio de las zoonosis que afectan a los animales salvajes es importante en el contexto de salud pública, sanidad animal y del medio ambiente. Este trabajo pretende revisar algunas de las principales zoonosis en mamíferos salvajes, especialmente en Brasil. La toxoplasmosis tiene una gran importancia en los primatas neotropicales y marsupiales australianos, fatal en estos casos. La prevención consiste en la higiene de los locales, destino adecuado de las heces de felinos y congelar la carne previamente antes de suministrársela a los animales. Se debe tener cuidado con especies pertenecientes a grupos de riesgo. Los murciélagos son los principales reservorios salvajes de la rabia. Las especies del orden Carnivora también tienen importancia en algunas regiones, como América del Norte, Europa y el nordeste de Brasil. El uso de vacunas en carnívoros salvajes terrestres de vida libre ha demostrado ser eficaz, y su aplicación en Brasil podría reducir los casos de rabia, como ha ocurrido en otros países. La leishmaniasis ha demostrado ser un gran problema de salud pública y en los últimos años una amenaza para la conservación de algunas especies mantenidas en cautiverio, tales como cánidos y primatas, cuando las mismas se encuentran en áreas endémicas para leishmaniasis visceral. Las medidas preventivas adoptadas en la actualidad se consideran poco eficaces, y se ha recomendado el uso de collares antiparasitarios a cánidos salvajes en cautiverio. Las informaciones sobre leptospirosis en animales salvajes son pocas en Brasil. La infección está presente en animales de vida libre, así como en animales mantenidos en los mayores zoológicos del país. Sin embargo, su papel como fuentes de infección, así como el impacto de la leptospirosis en animales salvajes, aún se desconoce. Las zoonosis discutidas pueden representar un riesgo para la salud pública, especialmente para en el caso de la rabia en América, Europa y África. La sanidad animal es un aspecto importante en algunos casos, como la leishmaniasis y toxoplasmosis, ya que determinadas especies pueden presentar lesiones graves y muerte cuando son acometidas por estas enfermedades.

Palabras clave: zoonosis, fauna, toxoplasmosis, rabia, leishmaniasis, leptospirosis

1. Introdução

As zoonoses são doenças ou infecções naturalmente transmissíveis entre os animais vertebrados e o homem (1). Seu estudo em animais selvagens tem adquirido grande importância nos últimos anos, envolvendo aspectos de saúde pública, animal e ambiental (2, 3). Como exemplo, temos algumas espécies que são reservatórios de enfermidades infecciosas ou parasitárias, as quais atuam como fontes de infecção para o homem (1). Além disso, algumas zoonoses podem causar lesões graves em determinadas espécies de animais selvagens, representando um risco para a conservação da fauna. E, por último, alterações ambientais podem estar envolvidas na maior ou menor incidência de algumas zoonoses (3), tais como o aumento do índice pluviométrico, da temperatura média, ou de áreas propícias para a reprodução de vetores. A crescente conscientização sobre a conservação do meio ambiente e proteção de espécies ameaçadas contribui para o interesse em pesquisas voltadas a esse tema.

O presente trabalho teve como objetivo revisar algumas das principais zoonoses em mamíferos selvagens (toxoplasmose, raiva, leishmaniose e leptospirose), especialmente no Brasil, focando na importância dos animais como reservatórios, como fontes de infecção, no impacto destas enfermidades e na sua prevenção, tanto no homem como nos mamíferos selvagens.

2. Toxoplasmose

2.1 Introdução

A toxoplasmose é considerada uma das doenças mais difundidas pelo mundo, causada pelo *Toxoplasma gondii*, protozoário intracelular do Filo Apicomplexa (4). Uma grande diversidade de espécies de mamíferos e aves é susceptível à infecção e à doença (5-9), havendo formação de cistos teciduais em diversos órgãos dos animais infectados. Os felídeos domésticos e selvagens são considerados os hospedeiros definitivos, capazes de eliminar oocistos pelas fezes, enquanto que as demais espécies são consideradas hospedeiros intermediários. As principais vias de transmissão, tanto nos hospedeiros definitivos como intermediários, são: ingestão de tecidos de animais infectados; ingestão de oocistos infectantes; e pela via transplacentária (10).

Tanto nos animais como no homem a infecção é extremamente comum e assintomática na maioria dos casos, havendo manifestação de sinais clínicos geralmente em associação com o comprometimento do sistema imune (4). No homem a toxoplasmose é frequente e grave em portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), bem como em casos de leucemia. Os sinais clínicos mais comuns no homem são dores musculares e articulares, febre, fadiga, dores de cabeça e linfadenopatia (11). Crianças recém nascidas infectadas durante a gestação podem apresentar quadros clínicos severos, como a Tétrade de Sabin, caracterizada por hidrocefalia, retardamento mental, calcificação cerebral e coriorretinite.

2.2 Toxoplasmose nos animais selvagens

Como ocorre nos animais domésticos e no homem, alguns fatores podem aumentar o risco de animais selvagens se infectarem pelo *T. gondii*. Estudos realizados no Brasil e na Austrália têm demonstrado que algumas espécies, como o gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), o cusu-zorro (*Trichosurus vulpecula*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o bugio (*Alouatta caraya*), apresentam maior risco de se infectar em áreas sob influência do homem e de animais domésticos (12-16). Uma possível explicação para esse fato seria a

maior população de felinos domésticos nas regiões urbanas/rurais do que de felinos selvagens em áreas naturais. Fatores biológicos, como dieta e o uso vertical do ambiente (arborícola ou terrestre) também podem influenciar o risco de infecção. Animais de dieta carnívora, devido à frequente ingestão de tecidos de outros animais, apresentam maior risco de se infectar em relação às espécies de dieta herbívora e onívora. Por outro lado, animais de hábito arborícola apresentam menor risco de infecção devido ao pouco contato com o solo e, conseqüentemente, com oocistos (17, 18). Um estudo realizado com 865 felinos silvestres cativos, provenientes de 86 instituições do Brasil, identificou os seguintes fatores de risco para a infecção neste grupo de animais: idade superior a 3 anos, consumo de carne previamente congelada a -20°C por período inferior a 7 dias, e consumo de animais eutanasiados, tais como bovino e equinos (19).

Não há estudos determinando a importância dos animais selvagens na transmissão do *T. gondii* para o homem. Porém, a alta soroprevalência em algumas espécies apreciadas por caçadores indicam que seu consumo pode representar uma via de transmissão (20). Em relação aos felídeos selvagens mantidos em cativeiro, estes representam uma fonte de infecção para o homem e outros animais localizados nas proximidades de seus recintos. Segundo Silva et al. (19), aproximadamente 54,6% (472/865) dos felinos neotropicais mantidos em cativeiro no Brasil foram sorologicamente positivos para a toxoplasmose.

O estresse crônico, situação comum em animais mantidos em cativeiro sob condições inadequadas, pode comprometer o sistema imune e, conseqüentemente, predispor a toxoplasmose. Mamíferos selvagens apresentam sinais clínicos semelhantes aos que ocorrem nos animais domésticos e estão relacionados principalmente às alterações neurológicas, respiratórias e oculares (21). Embora a toxoplasmose apresente baixa letalidade, dois grupos de animais são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. gondii*: os primatas neotropicais e os marsupiais australianos (20). As espécies pertencentes a estes grupos geralmente apresentam toxoplasmose aguda e fatal, com sinais clínicos inespecíficos e tratamento não-responsivo. Segundo um estudo conduzido em 33 primatas neotropicais acometidos por toxoplasmose na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (22), os sinais clínicos mais observados foram apatia (40,6%), dispnéia (18,7%), hipotermia (15,6%), secreção nasal sero-sanguinolenta ou espumosa (12,5%), anorexia (9,4%) e vômito (9,4%). Em 43,7% dos casos os animais vieram a óbito sem apresentar sinais clínicos. Nos marsupiais australianos são comuns depressão, anorexia, febre, alterações neurológicas, cegueira, dispnéia, diarreia e morte súbita (23, 24). Portanto, a toxoplasmose possui particular importância em programas que envolvem a conservação de espécies de primatas neotropicais e marsupiais australianos.

2.3 Prevenção

A prevenção da toxoplasmose em animais selvagens mantidos em cativeiro consiste em lavar bem os alimentos fornecidos, congelar a carne a -20°C por 15 dias, controlar a população de gatos domésticos errantes e outros animais sinantrópicos, limpeza diária dos recintos e destino adequado às fezes dos felinos. No caso de primatas neotropicais e marsupiais australianos, cuidados especiais devem ser adotados, como utilizar proteção nos calçados (propés ou sacos plásticos) ao entrar nos recintos, não permitir que o funcionário responsável também tenha acesso ao recinto dos felinos, e evitar que o recinto destes animais seja próximo ao dos felinos (12). A prevenção da toxoplasmose em animais de vida livre não é praticada. Já a prevenção no homem consiste em não ingerir carne crua ou mal cozida de aves e mamíferos selvagens, embora poucas sejam as espécies cuja criação e comércio são permitidos no Brasil. O controle da infecção nos felinos, higiene dos recintos e o destino adequado de suas fezes também é importante no controle da toxoplasmose humana transmitida por animais selvagens.

3. Raiva

3.1 Introdução

A raiva é considerada uma das enfermidades mais temidas no mundo devido à sua alta letalidade e inexistência de tratamento eficaz. O agente etiológico consiste em um vírus RNA, envelopado, da família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus* (25). A infecção ocorre principalmente pela mordida de um mamífero infectado, enquanto que outras vias de transmissão menos comuns envolvem o contato com a saliva e arranhaduras de animais raivosos. Os sinais clínicos presentes tanto no homem como nos animais se caracterizam por alterações neurológicas. Na raiva humana se destacam agitação, hidrofobia, aerofobia, salivação excessiva, paralisia, coma e morte (26).

Acredita-se que todos os mamíferos são susceptíveis à raiva e devem ser considerados como potenciais transmissores. A epidemiologia da raiva varia dependendo da região, mas de forma geral os principais reservatórios são os cães e gatos domésticos, quirópteros, e algumas espécies de carnívoros selvagens (27-29). Em relação aos principais transmissores da raiva para o homem, se destacam os cães e gatos domésticos nos países em desenvolvimento, como Brasil, Índia e diversos países da África. Os mamíferos terrestres, principalmente os da ordem Carnivora, são os maiores responsáveis pela transmissão nos países desenvolvidos, como o *racoon* (*Procyon lotor*) nos Estados Unidos da América (EUA), e a raposa (*Vulpes vulpes*) na Europa (30, 31). Pouco se sabe sobre o impacto da raiva na população de animais selvagens, e quais as implicações desta enfermidade na conservação de espécies ameaçadas. Portanto, atualmente a raiva em animais selvagens possui maior importância no contexto de saúde pública.

3.2 Raiva nos animais selvagens

Entre os animais selvagens considerados reservatórios de raiva, os mais importantes são os pertencentes às ordens Quiróptera e Carnivora. No Brasil diversas espécies de quirópteros estão envolvidas na transmissão para os humanos, especialmente na região norte e nordeste do país. Segundo Sodré, Gama e Almeida (32) as espécies de quirópteros pertencentes às famílias Phyllostomidae, Vespertilionidae e Molossidae são as que apresentam maior positividade para raiva no Brasil. A raposa-do-campo (*Dusicyon vetulus*) e os saguis-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) também são considerados importantes reservatórios na região nordeste (33, 34), enquanto que nas demais regiões do país pouco se sabe sobre a raiva em mamíferos terrestres.

Animais selvagens raivosos, assim como os domésticos, apresentam sinais clínicos de ordem neurológica, como apatia, paralisia, alteração de comportamento e dificuldade locomotora. Em carnívoros se destaca o aumento da agressividade, especialmente aqueles pertencentes à família Canidae (25). Os quirópteros apresentam dificuldade em voar, ou voam durante o dia, incoordenação motora, excitabilidade, e frequentemente são encontrados apáticos no chão (27).

3.3 Prevenção

A prevenção da raiva em mamíferos de cativeiro pode ser realizada pela utilização de vacinas comerciais, com vírus inativados, destinadas às espécies domésticas, conforme praticado em alguns zoológicos do Brasil. Em nosso país não há legislação referente à vacinação de mamíferos selvagens contra raiva em instituições que mantêm estes espécimes em cativeiro, e os animais sempre são considerados como não vacinados em caso de acidentes envolvendo o homem. Mas essa prática continua sendo realizada em diversos países, pois as

vacinas inativadas oferecem um risco mínimo aos animais e, segundo alguns estudos, há evidências de proteção vacinal em determinadas espécies (35).

Mamíferos selvagens de vida livre não são vacinados no Brasil, mas em alguns países desenvolvidos, como EUA, Canadá, França e Alemanha, são realizadas vacinações em mamíferos terrestres (36, 37). A vacina é formulada como isca e sua administração é realizada por via oral. Essa prática consiste em selecionar as áreas (geralmente florestas) de maior ocorrência de espécies consideradas importantes na transmissão da raiva, e distribuir as vacinas utilizando-se aviões. Essa atividade é realizada há muitos anos, e diversos estudos têm comprovado sua eficácia na redução do número de animais raivosos (38). No Brasil esta forma de controle poderia ser adotada nas regiões onde os canídeos silvestres são considerados importantes reservatórios. Todavia, pesquisas por meio de projetos pilotos devem ser realizadas para verificar a eficácia desta medida preventiva.

Embora os quirópteros representem grande parte dos reservatórios selvagens de raiva no mundo, sua vacinação não é realizada devido à ausência de vacinas comerciais, ou próprias para as diferentes espécies de morcegos. Alguns estudos têm demonstrado resultados promissores em experimentos onde quirópteros mantidos em cativeiro foram submetidos à vacinação (39, 40). Recomenda-se a pesquisa de circulação viral em colônias de morcegos de forma controlada, especialmente em casos de se encontrar animais mortos ou moribundos, tanto em área rural como urbana.

As medidas de controle e profilaxia incluem: prevenção da raiva nos animais em cativeiro pela vacinação; cuidado ao manipular animais, pela utilização de equipamentos de proteção individual; e procurar atendimento médico em casos de acidentes envolvendo mordeduras e/ou arranhaduras de mamíferos selvagens, principalmente canívoros, quirópteros e primatas. Se há algum fator de risco nas atividades ocupacionais, como contato com morcegos, cães e gatos errantes, os profissionais devem se submeter ao esquema imunoprolático pré-exposição de acordo com a organização mundial da saúde (41), com acompanhamento sorológico periódico para avaliação de títulos de anticorpos soroneutralizantes.

4. Leishmaniose

4.1 Introdução

As leishmanioses compreendem um complexo de enfermidades de características distintas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (42). São consideradas um grande problema de saúde pública devido às dificuldades relacionadas à prevenção e tratamento dos doentes. Sua distribuição compreende o continente americano, África, sul da Europa, oriente médio e algumas regiões do sul da Ásia (43). Existem basicamente dois tipos de leishmanioses: a visceral (LV) e a cutânea (LC). Diversos aspectos diferenciam estas enfermidades. No entanto, serão abordadas somente informações básicas referentes à etiologia, epidemiologia e clínica, uma vez que o foco do presente trabalho são as leishmanioses nos animais selvagens. A LV é causada por parasitas pertencentes ao complexo *L. (Leishmania) donovani*, sendo que no Brasil a espécie responsável é a *L. chagasi* (44). As LCs são causadas por diversas espécies, seis de ocorrência no Brasil: *L. amazonensis*; *L. braziliensis*; *L. guyanensis*; *L. lainsoni*; *L. naiffi*; e *L. shawi* (45).

As leishmanioses apresentam ciclo heterógeno, cujos mamíferos são considerados os principais reservatórios, e os mosquitos da subfamília Phlebotominae, popularmente chamados de flebotomíneos, são os vetores. O cão doméstico é o principal reservatório da LV, enquanto que algumas espécies de animais selvagens são os reservatórios mais importantes das LCs, como os roedores (ordem Rodentia) e marsupiais (ordem Didelphimorphia). A

infecção ocorre pela picada do mosquito, o qual inocula o protozoário durante o repasto sanguíneo. O vetor se infecta da mesma forma, ingerindo o parasita ao se alimentar do sangue de um animal infectado (46).

No homem as LC se caracterizam principalmente por lesões cutâneas ulceradas e edemaciadas no local da picada do vetor e, eventualmente, disseminadas pelo corpo (47). Os sinais clínicos mais comuns na LV são hepato-esplenomegalia, anemia, febre, icterícia, edemas generalizados e hemorragias (48). Os cães domésticos, ao contrário do que ocorre no homem, apresentam quadro clínico clássico quando acometidos tanto pela LC como pela LV. As alterações mais comuns são apatia, anorexia, perda de peso, vômitos, lesões cutâneas ulceradas e alopecias (principalmente em focinho e pina), epistaxe, linfadenopatia e onicogribose (43).

4.2 Leishmaniose nos animais selvagens

De forma geral, as principais espécies de animais selvagens consideradas reservatórios da LC são: cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), quati (*Nasua nasua*), gambás (*Didelphis* spp.) e roedores de diversas espécies (*Rattus rattus*, *Agouti paca*, *Oryzomys subflavus*, *Nectomys squamipes*, *Bolomys lasiurus*, *Proechimys* sp., *Rhipidomys* sp., *Akodon* sp. e *Thrichomys apereoides*) (45, 49-52). O gambá, assim como o cão doméstico, possui papel como reservatório da LV, principalmente na região sudeste do país. Diversas espécies de mosquitos do gênero *Lutzomyia* são os transmissores da LC, enquanto que a LV tem como principal vetor a *Lutzomyia longipalpis*.

A identificação de reservatórios não implica necessariamente na sua importância como transmissor para outras espécies, nem na manutenção do ciclo do parasita. Dentre muitos fatores, é necessário que a infectividade para o vetor seja eficiente. Estudos voltados para esse tema necessitam do xenodiagnóstico, uma técnica pouco disponível e pouco utilizada, principalmente no Brasil. Um importante estudo realizado por Courtenay et al. (53), no Estado do Pará, demonstrou uma alta prevalência de cachorros-do-mato (*C. thous*) infectados por *L. chagasi*, mas uma baixa infectividade dos mesmos, sugerindo que essa espécie seja um reservatório de pouca importância na região estudada.

Durante muitos anos a maioria dos estudos direcionados aos animais selvagens se limitou à identificação de reservatórios. Devido à urbanização da LV, foi observado nos últimos anos que muitas espécies de animais selvagens mantidas em cativeiro podem ser acometidas, e até mesmo desenvolver quadros clínicos graves, chegando ao óbito. Este fato tem ocorrido especialmente no Brasil, onde as leishmanioses são endêmicas e existe um grande número de instituições que mantêm animais selvagens em cativeiro. Portanto, o estudo das leishmanioses em animais selvagens atualmente possui importância não somente no contexto de saúde pública, mas também na conservação de espécies ameaçadas.

Os animais selvagens apresentam sinais clínicos semelhantes aos cães domésticos, especialmente os da família Canidae. Raramente se observam sinais clínicos em animais de vida livre, e, quando presentes, são de pouca gravidade. Ou os animais de vida livre raramente adoecem na natureza, ou a mortalidade dos doentes não permite que estes indivíduos sejam observados. O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), cachorro-vinagre (*Sphingos venaticus*), e raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) estão entre as espécies mais descritas na literatura acometidas por leishmaniose (54-57). Malta et al. (58) estudaram a infecção por *L. chagasi* em 41 primatas de diversas espécies no zoológico de Belo Horizonte (MG), uma área endêmica para leishmaniose visceral. Um dos animais (Sauá, *Callicebus nigrifrons*) apresentou sinais clínicos compatíveis com a enfermidade, e sua infecção foi confirmada pela técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e imunistoquímica. Outros 17 primatas assintomáticos também foram positivos pela PCR.

4.3 Prevenção

A prevenção da leishmaniose no homem, animais domésticos e selvagens tem se mostrado complexa e pouco eficiente devido a uma série de fatores inerentes às características da doença em cada região, como reservatórios, vetores, clima e condições socioeconômicas (44, 43). O controle em animais de vida livre é considerado uma atividade praticamente impossível de ser realizada, pois envolveria ou o tratamento dos animais, ou a eutanásia dos mesmos. Em alguns zoológicos são utilizadas telas contra mosquitos e coleiras antiparasitárias nos canídeos. Porém, a eficácia destes métodos ainda não foi comprovada. A prevenção da leishmaniose humana consiste em prevenir e controlar a infecção nos animais de cativeiro (conforme descrito acima), controle do vetor e cuidados pessoais ao entrar em florestas nas áreas endêmicas, como o uso de repelentes, calças e camisas de mangas compridas.

5. Leptospirose

5.1 Introdução

Diversas espécies de bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* são as responsáveis pela leptospirose. Atualmente são conhecidos mais de 200 sorovares, os quais consistem em variedades baseadas nas características fenotípicas das leptospirosas (59). Sua distribuição é mundial, com maior ocorrência nas regiões tropicais, onde as condições de umidade e temperatura favorecem a sobrevivência da bactéria no ambiente.

A infecção ocorre principalmente pela via oral e pela penetração ativa da bactéria pelas mucosas ou soluções de continuidade, tanto de forma direta (contato com animais infectados), como indireta (contato com água contaminada). A letalidade é considerada baixa, com o quadro clínico variando de assintomático à grave, chegando à morte. Os sinais clínicos mais comuns, tanto no homem como nos animais, são: febre, dores musculares, icterícia, hemorragias generalizadas, pneumonia e insuficiência renal (59). Nos animais se destacam abortamento, nascimentos prematuros, natimortos, e infertilidade. Uma grande quantidade de mamíferos pode atuar como reservatórios de *Leptospira* spp., como cães domésticos, bovinos, ovinos, suínos, javalis e quirópteros (60). O reservatório mais importante é o roedor sinantrópico *Rattus norvegicus* (61), popularmente chamado de ratazana. A espécie *Leptospira interrogans*, sorovar Icterohaemorrhagiae, é altamente adaptada a este reservatório (59), no qual a infecção renal e eliminação pela urina podem durar anos. A ratazana é encontrada em todo o mundo, vivendo como animal sinantrópico próximo de habitações humanas e animais domésticos, o que aumenta sua importância como fonte de infecção.

5.2 Leptospirose nos animais selvagens

A infecção por *Leptospira* spp. nos animais selvagens é extremamente comum em várias espécies, e diversos estudos baseados em inquéritos sorológicos já foram realizados tanto no Brasil como no exterior (17, 62-64). Vários zoológicos do Brasil já foram alvos de levantamentos sorológicos para leptospirose (quadro 1). Portanto, animais selvagens em cativeiro e em vida livre estão expostos à *Leptospira* spp., mas pouco se sabe sobre sua importância como fontes de infecção. A maioria dos estudos sobre o assunto é direcionada aos roedores sinantrópicos, enquanto que informações sobre a transmissão dos animais selvagens para o homem são escassas. Esteves et al. (65) e Ullmann (66) estudaram a soroprevalência para leptospirose nos zoológicos de Uberaba (MG) e Sorocaba (SP), respectivamente, e embora diversas espécies apresentassem resultado positivo, nenhum dos funcionários

apresentou títulos de anticorpos para a enfermidade, indicando que nas instituições estudadas os animais provavelmente não representaram uma fonte de infecção para o homem.

Estudos envolvendo o risco que a leptospirose representa para os animais selvagens são muito escassos, principalmente no Brasil. Espécies da ordem Pinnipedia, como leões-marinhos (*Zalophus californianus*), focas (*Callorhinus ursinus*) e elefantes-marinhos (*Mirounga angustirostris*) já foram descritas acometidas pela leptospirose. Diversos casos já foram relatados na América do Norte envolvendo estas espécies (67-70). As leptospirosas mais comuns incluem *L. interrogans* e *L. kirschneri*, e os sinais clínicos apresentados são depressão, polidipsia, desidratação, relutância em mover os membros posteriores, febre, anorexia, perda de peso e, em casos extremos, tremores, vômito e dor abdominal (71). Um importante estudo descrito por Szonyi et al. (72) comprovou a susceptibilidade de macacos prego (*Cebus* spp.) à leptospirose. Os autores relataram um surto em um grupo de 52 indivíduos mantidos em cativeiro na Colômbia, onde 37 desenvolveram sinais clínicos compatíveis com leptospirose e 14 vieram a óbito. Os animais apresentaram letargia, emaciação, desidratação, icterícia, linfadenomegalia, mucosas pálidas, dificuldade respiratória, hepatomegalia, renomegalia, melena, hemorragia pulmonar, linfonodos hemorrágicos, congestão hepática e renal. A provável fonte de infecção foram roedores sinantrópicos, e o agente etiológico foi identificado pela PCR como *L. interrogans*.

5.3 Prevenção

A prevenção da leptospirose inclui boas práticas de higiene, limpeza dos recintos, fornecimento de água limpa, drenagem de áreas alagadas, controle de roedores sinantrópicos e avaliação sorológica periódica nos animais (73). A prevenção no homem inclui o controle da leptospirose nos animais selvagens, utilização de equipamento de proteção individual, tais como luvas e botas, e evitar contato com água alagada, potencialmente contaminada. A prevenção em animais selvagens de vida livre não é realizada.

Quadro 1. Prevalência de anticorpos, sorovares mais frequentes e espécies mais acometidas pela infecção por *Leptospira* spp. em zoológicos do Brasil.

Zoológico	Soroprevalência	Sorovares mais frequentes	Espécies mais acometidas	Referência
São Paulo	19,5% (59/302)	Copenhageni, Pomona, Castellonis	não relatado	74
Rio de Janeiro	37,7% (26/76)	Icterohaemorrhagiae	cachorro do mato, lobo guará, quati, tamanduá mirim, macaco aranha	75
Uberaba	10,2% (17/166)	Canicola, Icterohaemorrhagiae, Andamana	tilápia do Nilo, jaguatirica, onça parda	65
Aracaju	12,5% (4/32)	Copenhageni	macaco prego, cachorro do mato, mão pelada	76
Ribeirão Preto	26,5% (103/388)	Patoc, Andamana, Icterohaemorrhagiae, Panama	Não relatado	77
Sorocaba	5,9% (12/203)	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Sentot	quati, anta, cachorro-do-mato	66

6. Considerações finais

As zoonoses discutidas no presente trabalho podem ser transmitidas dos animais selvagens para humanos. Esse fato tem sido demonstrado especialmente no caso da raiva. Embora poucos estudos sobre o tema tenham sido realizados em relação à toxoplasmose e a leishmaniose, a grande quantidade de reservatórios selvagens para ambas as enfermidades sugere que os mesmos podem atuar como fontes de infecção para humanos e outros animais. A infecção por *Leptospira* spp. está amplamente distribuída em animais selvagens, mas são necessários estudos para determinar seu impacto nas diversas espécies animais, bem como o papel dos mesmos como reservatórios.

7. Referências

1. Marvulo MFV. Zoonoses. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens. São Paulo: Roca; 2006. p.1250-6.
2. Chomel BB, Belotto A, Meslin FX. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:6-11.
3. Souza MJ. One health: zoonoses in the exotic animal practice. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2011;14:421-6.
4. Tenter AM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30:1217-58.
5. Dubey JP. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet Parasitol.* 2002;106:121-53.
6. Ullmann LS, Guimarães FF, Fornazari F, Tomé RO, Camossi LG, Greca H, et al. Toxoplasmosis infection in wild animals. In: *Toxoplasma Centennial Congress*; 2008, Búzios. Búzios: UENF; 2008. p.50.
7. Fornazari F, Langoni H, Silva RC, Guazzelli A, Ribeiro MG, Chiacchio SB. *Toxoplasma gondii* infection in wild boars (*Sus scrofa*) bred in Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;164:333-4.
8. Catenacci LS, Griese J, Silva RC, Langoni H. *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in captive crab-eating foxes, *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) from Brazil. *Vet Parasitol.* 2010;169:190-2.
9. Jokelainen P, Isomursu M, Näreaho A, Oksanen A. Natural *Toxoplasma gondii* infections in European brown hares and mountain hares in Finland: proportional mortality rate, antibody prevalence, and genetic characterization. *J Wildl Dis.* 2011;47:154-63.
10. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8:634-40.
11. Dubey JP. Toxoplasmosis in humans (*Homo sapiens*). In: *Toxoplasmosis of animals and humans*. Boca Raton: CRC Press; 2010. p.73-93.

12. Vitaliano SN, Silva DAO, Mineo TWP, Ferreira RA, Bevilacqua E, Mineo JR. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. *Vet Parasitol.* 2004;122:253-60.
13. Garcia JL, Svoboda WK, Chryssafidis LA, Malanski LS, Shiozawa MM, Aguiar LM, et al. Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in wild New World Monkeys (*Cebus* spp., *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Paraná State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;133:307-11.
14. Hill NJ, Dubey JP, Vogelnest I, Power MI, Deane EM. Do free ranging common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) play a role in the transmission of *Toxoplasma gondii* within a zoo environment? *Vet Parasitol.* 2008;152:202-9.
15. Forman D, West N, Francis J, Guy E. The sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* in British marine mammals. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:296-8.
16. Fornazari F, Teixeira CR, Silva RC, Leiva M, Almeida SC, Langoni H. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* among Brazilian white-eared opossums (*Didelphis albiventris*). *Vet Parasitol.* 2011;179:238-41.
17. Thoisy B, Demar M, Aznar C, Carme B. Ecologic correlates of *Toxoplasma gondii* exposure in free-ranging neotropical mammals. *J Wildl Dis.* 2003;39:456-9.
18. Fornazari F, Teixeira CR, Silva RC, Teixeira RHF, Nunes ALV, Leiva M, et al. Estudo da infecção pelo *Toxoplasma gondii* e pesquisa do vírus rábico em animais silvestres e exóticos da região central do estado de São Paulo. In: *Anais do 19º Encontro e 13º Congresso da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens; 2010, Campos do Jordão. Campos do Jordão: ABRAVAS; 2010. p.85-9.*
19. Silva JCR, Marvulo MFV, Dias RA, Ferreira F, Amaku M, Adania CH, et al. Risk factors associated with sero-positivity to *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Prev Vet Med.* 2007;78:286-95.
20. Silva JCR. Toxoplasmose. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. *Tratado de animais selvagens.* São Paulo: Roca; 2006. p.768-84.
21. Wolfe BA. Toxoplasmosis. In: Fowler ME, Miller RE. *Zoo and wild animal medicine.* 5th ed. St. Louis, Missouri: Saunders; 2003. p.745-9.
22. Epiphanyo S, Sinhorini IL, Catão-Dias JL. Pathology of toxoplasmosis in captive new world primates. *J Comp Pathol.* 2003;129:196-204.
23. Holz P. Marsupialia (Marsupials). In: Fowler ME, Miller RE. *Zoo and wild animal medicine.* 5th ed. St. Louis, Missouri: Saunders, 2003. p.288-303.
24. Portas TJ. Toxoplasmosis in macropodids: a review. *J Zoo Wildl Med.* 2010;41:1-6.
25. Greene CE, Rupprecht CE. Rabies and other Lyssavirus infections. In: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat.* 3rd ed. St. Louis, Missouri: Saunders; 2006. p.167-86.

26. Dimaano EM, Scholand SJ, Alera MTP, Belandres DB. Clinical and epidemiological features of human rabies cases in the Philippines: a review from 1987 to 2006. *Int J Infect Dis.* 2011;15:e495-9.
27. Megid J. Raiva. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. *Tratado de animais selvagens.* São Paulo: Roca; 2006. p.785-98.
28. Langoni H, Souza LC, Zetun CB, Silva TCC, Hoffmann JL, Silva RC. Serological survey for rabies in serum samples from vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Botucatu region, SP, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2008;14:651-9.
29. Banyard AC, Hayman D, Johnson N, Mcelhinney I, Fooks AR. Bats and lyssaviruses. *Adv Virus Res.* 2011;79:239-89.
30. Singer A, Kauhala K, Holmala K, Smith GC. Rabies risk in raccon dogs and foxes. *Dev Biol.* 2008;131:213-22.
31. Yousey-Hindes K, Newman A, Eidson M, Rudd R, Trimarchi C, Cherry B. Rabid foxes, rabid raccons, and the odds of a human bite exposure, New York State, 1999-2007. *J Wildl Dis.* 2011;47:228-32.
32. Sodré MM, Gama AR, Almeida MF. Updated list of bats species positive for rabies in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2010;52:75-81.
33. Favoretto SR, Mattos CC, Morais NB, Araujo FAA, Mattos CA. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:1062-5.
34. Bernardi F, Nadin-Davis SA, Wandeler AI, Armstrong J, Gomes AAB, Lima FS, et al. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. *J Gen Virol.* 2005;86:3153-62.
35. Calle PP. Rabies. In: Fowler ME, Miller RE. *Zoo and wild animal medicine.* 5th ed. St. Louis, Missouri: Saunders; 2003. p.732-6.
36. Wandeler AI. The rabies situation in western Europe. *Dev Biol.* 2008;131:19-95.
37. Slate D, Algeo TP, Nelson KM, Chipman RB, Donovan D, Blanton JD, et al. Oral rabies vaccination in North America: opportunities, complexities, and challenges. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3:e549.
38. Cross ML, Buddle BM, Aldwell FE. The potential of oral vaccines for disease control in wildlife species. *Vet J.* 2007;174:472-80.
39. Almeida MF, Martorelli LFA, Aires CC, Barros RF, Massad E. Vaccinating the vampire bat *Desmodus rotundus* against rabies. *Virus Res.* 2008;137:275-7.
40. Turmelle AS, Allen LC, Schmidt-French BA, Jackson FR, Kunz TH, McCracken GF, et al. Response to vaccination with a commercial inactivated rabies vaccine in a captive colony of Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*). *J Zoo Wildl Med.* 2010;41:140-3.

41. World Health Organization. Rabies [Internet]. 2011 [cited 2011 Out 8]. Available from: www.who.int/en/
42. Nozais JP. The origin and dispersion of human parasitic diseases in the Old World (Africa, Europe and Madagascar). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98:13-9.
43. Baneth G. Leishmaniasis. In: Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed. St. Louis, Missouri: Saunders; 2006. p.685-9.
44. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004;7:338-49.
45. Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev Bras Epidemiol. 2004;7:328-37.
46. Quinzel RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir host and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology. 2009;136:1915-34.
47. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 3ª ed. Brasília: Editora MS; 2007. p.45.
48. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas. Brasília: Editora MS; 2006. p.9.
49. Mello DA, Rego Jr FA, Oshozo E, Nunes VLB. *Cerdocyon thous* (L.) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1973) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988;83:259.
50. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EEA, Souza AAA. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia, Dasyproctidae), no estado do Pará, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1991;33:18-22.
51. Brandão-Filho SP, Carvalho FG, Brito ME, Almeida FA, Nascimento LA. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: eco-epidemiological aspects in “Zona da Mata” region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994;89:445-9.
52. Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *brasiliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003;97:291-6.
53. Courtenay O, Quinzel RJ, Garcez LM, Dye C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. Parasitology. 2002;125:407-14.
54. Figueiredo FB, Gremião IDF, Pereira SA, Fedulo LP, Menezes RC, Balthazar DA, et al. First report of natural infection of a bush dog (*Speotus venaticus*) with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;102:200-1.

55. Luppi MM, Malta MCC, Silva TMA, Silva FL, Motta ROC, Miranda I, et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Vet Parasitol.* 2008;155:146-51.
56. Lima VMF, Fattori KR, Michelin AF, Nogueira FS, Souza LO. Evidence of *Leishmania* spp. antibodies and DNA in bush dogs (*Speotus venaticus*) in Brazil. *J Zoo Wildl Med.* 2009;40:91-4.
57. Souza NP, Almeida ABPF, Freitas TPT, Paz RCR, Dutra V, Nakazato L, et al. *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43:333-5.
58. Malta MC, Tinoco HP, Xavier MN, Vieira AL, Costa EA, Santos RL. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Vet Parasitol.* 2010;169:193-7.
59. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet.* 2003;3:757-71.
60. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. A brief overview of the disease, leptospirosis. In: *Leptospira and leptospirosis.* 2nd ed. Melbourne: MediSci; 1999. p.67-72.
61. Mohan Rao AMK. Preventive measures for leptospirosis: rodent control. *Indian J Med Microbiol.* 2006;24:325-8.
62. Lilenbaum W, Varges R, Moraes IA, Ferreira AM, Pissinatti A. Leptospiral antibodies in captive lion tamarins (*Leontopithecus* sp.) in Brazil. *Vet J.* 2005;169:462-4.
63. Jung BY, Choi JS, Kim KT, Song YK, Lee SH, Lee KW, et al. Seroprevalence of leptospirosis in Korean municipal zoo animals. *J Vet Med Sci.* 2007;69:861-3.
64. Silva RC, Zetun CB, Bosco SM, Bagagli E, Rosa PS, Langoni H. *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. infection in free-ranging armadillos. *Vet Parasitol.* 2008;157:291-3.
65. Esteves FM, Guerra-Neto G, Girio RJD, Silva-Vergara ML, Carvalho ACFB. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários do zoológico municipal de Uberaba, MG. *Arq Inst Biol.* 2005;72:283-8.
66. Ullmann LS. Inquérito sorológico, molecular, e fatores de risco para a leptospirose em mamíferos cativos, papel dos animais sinantrópicos presentes no local e aspectos de saúde pública [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2011.
67. Acevedo-Whitehouse K, Cueva H, Gulland FMD, Auriol-Gamboa D, Arellano-Carbajal F, Suarez-Güemez F. Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California. *J Wildl Dis.* 2003;39:145-51.
68. Colegrove KM, Lowenstine LJ, Gulland FMD. Leptospirosis in Northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) stranded along the California coast. *J Wildl Dis.* 2005;41:426-30.

69. Cameron CE, Zuerner RL, Raverty S, Colegrove KM, Norman SA, Lambourn DM, et al. Detection of pathogenic *Leptospira* bacteria in pinniped populations via PCR and identification of a source of transmission for zoonotic leptospirosis in the marine environment. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1728-33.
70. Norman SA, Digiacomio RF, Gulland FMD, Meschke JS, Lowry MS. Risk factors for an outbreak of leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) in California, 2004. *J Wildl Dis*. 2008;44:837-44.
71. Ruoppolo V. Pinnipedia (Lobo-marinho, Leão-marinho, Foca, Morsa). In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens. São Paulo: Roca; 2006. p.683-700.
72. Szonyi B, Agudelo-Flórez P, Ramírez M, Moreno N, Ko AI. An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (*Cebus*) monkeys. *Vet J*. 2011;188:237-9.
73. Corrêa SHR. Leptospirose. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens. São Paulo: Roca; 2006. p.736-41.
74. Corrêa SH, Vasconcellos SA, Morais Z, Teixeira AA, Dias RA, Barros MA, et al. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2004;41:189-93.
75. Lilenbaum W, Monteiro RV, Ristow P, Fraguas S, Cardoso VS, Fedullo LPP. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Res Vet Sci*. 2002;73:319-21.
76. Pimentel JS, Gennari SM, Dubey JP, Marvulo MFV, Vasconcellos SA, Morais ZM, et al. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. *Pesqui Vet Bras*. 2009;29:1009-14.
77. Silva CS, Gírio RJS, Guerra Neto G, Brich M, Santana LAS, Amâncio FH, et al. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em animais selvagens do zoológico municipal de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2010;47:237-42.

Recebido em: 16/05/2012

Aceito em: 08/11/2013

LINFADENITE SUÍNA POR *Rhodococcus equi*: ASPECTOS GERAIS DA AFECCÃO, VIRULÊNCIA DAS LINHAGENS EM SUÍNOS E HUMANOS.

Gustavo Henrique Batista Lara^{1*}
Márcio Garcia Ribeiro²

RESUMO

A linfadenite infecciosa (pio)granulomatosa é a principal manifestação clínica causada pelo *Rhodococcus equi* nos suínos gerando altos prejuízos com a condenação de carcaças em abatedouros e pelo potencial zoonótico dos micro-organismos. Recentemente tem-se investigado a virulência associada aos plasmídios (Vap) em linhagens de *R. equi* isolados de suínos. O perfil encontrado nos isolados de suínos é semelhante ao de humanos com rodococose (VapB), particularmente acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids). O presente estudo revisou os principais aspectos da rodococose em suínos, com ênfase nas propriedades de virulência de *R. equi*, nos achados epidemiológicos e nos aspectos de Saúde Pública.

Palavras-chave: *Rhodococcus equi*, linfadenite, suídeos, plamídeos associados a virulência

SWINE LYMPHADENITIS BY *Rhodococcus equi*: GENERAL ASPECTS OF DISEASE, VIRULENCE OF THE STRAINS IN SWINE AND HUMANS.

ABSTRACT

The (pyo)granulomatous infections lymphadenitis is major clinical manifestation caused by *Rhodococcus equi* in swine causing losses in the carcass condemnation in abattoirs and the zoonotic potential of agents. Recently, virulence associated to plasmids (Vap) of *R. equi* isolates has been investigated. Plasmid profile found in pigs is similar to observed in humans with rhodococcosis (VapB), particularly infected by acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The aim of present study was to review the major aspects of swine rhodococcosis, with emphasis to virulence mechanisms of bacterium, epidemiology and public health concern.

Keywords: *Rhodococcus equi*, lymphadenitis, swine, plasmids associated with virulence

LINFADENITIS PORCINA POR *Rhodococcus equi*: ASPECTOS GENERALES DE AFECCIÓN, LA VIRULENCIA DE LAS CEPAS EN CERDOS Y SERES HUMANOS.

RESUMEN

La linfadenitis infecciosa (pio) granulomatosa es la principal manifestación clínica causada por *Rhodococcus equi*. En los cerdos causan elevadas pérdidas en la condena de las canales en los mataderos, y el potencial zoonótico de los microorganismos. Recientemente, se ha investigado la virulencia asociados con plásmideos (Vap) en cepas de *R. equi* aislados de

¹ Médico Veterinário – Doutorando – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu *autor de correspondência

² Médico Veterinário – Docente da Disciplina Enfermidades Infecciosas dos Animais, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu

cerdos. El perfil encontrado en aislamientos de cerdos es similar al de los seres humanos con rodococosis (VapB), especialmente afectado por el síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA). Este estudio examinó los aspectos principales de rodococosis en cerdos con énfasis en las propiedades de virulencia de *R. equi*, en los aspectos epidemiológicos y de salud pública.

Palabras clave: *Rhodococcus equi*, linfadenitis, porcina, asociado con plásmidos de virulencia

INTRODUÇÃO

A carne suína é o produto de origem animal mais consumido em todo mundo, representando 50% do consumo global de carne (1). Segundo a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIPÉCS), a produção mundial de carne suína foi da ordem de 101.127 milhões de toneladas em 2011(2). O Brasil é o quarto produtor mundial de suínos, superado pela China, União Europeia e EUA. Estes países são responsáveis por 96% da exportação mundial da carne suína (2, 3).

O Brasil é o quinto consumidor mundial de carne suína, superado somente pelos países supracitados além da Rússia (2). A produção brasileira de carne suína no ano de 2011 foi estimada em 3,5 milhões de toneladas, proveniente de 36,2 milhões de suínos abatidos sob fiscalização da inspeção federal (4). O Brasil exportou 582 mil toneladas de carne suína, obtendo uma receita de 1,43 bilhões de dólares em 2011. A suinocultura movimenta ao redor de um milhão de empregos diretos e indiretos no Brasil, e é considerada uma das mais importantes divisas do agronegócio do país (2).

Paradoxalmente, por questões socioeconômicas, culturais e de saúde animal, o consumo de carne suína “per capita” no Brasil ainda é considerado baixo, em torno de 13,8 kg/ano, significativamente inferior ao consumo de carne bovina (36 kg/ano) e de frango (37 kg/ano). O baixo consumo interno impõe aos suinocultores nacionais a necessidade do incremento na qualidade de seus produtos e redução de custos, visando atender às exigências do mercado internacional (3).

Dentre as principais doenças infecciosas que acometem a suinocultura no Brasil e em todo o mundo, merece destaque a linfadenite granulomatosa, geralmente diagnosticada na linha de abate, causando elevados prejuízos econômicos com a condenação de carcaças (5), bem como reflexos em saúde pública, devido ao potencial zoonótico dos agentes causais da doença, principalmente para pessoas imunossuprimidas (6). Estudo realizado na região Sul do Brasil em 1999, revelou o impacto econômico negativo para a suinocultura decorrente da linfadenite granulomatosa, variando de 6,9 a 8,0 milhões de reais (7).

A prática de condenação das carcaças, apresentando linfadenite granulomatosa suína, em abatedouros é creditada ao potencial zoonótico de vários micro-organismos envolvidos na gênese desta doença, em especial *Rhodococcus equi* (*R. equi*) e bactérias do gênero *Mycobacterium* (5, 6). Justifica-se, também, pela impossibilidade de se distinguir, macroscopicamente na linha do abate, as lesões em linfonodos causadas por outros agentes, como os gêneros *Staphylococcus*, *Nocardia*, *Streptococcus* e *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *pyogenes* (8, 9).

Nos suínos, a rodococose está praticamente restrita ao trato linfático. Os linfonodos mais comumente acometidos são os submandibulares e da cadeia mesentérica (10, 11). Nesta espécie, raramente *R. equi* se dissemina dos linfonodos e atinge outros órgãos (9).

Nos últimos anos, a rodococose humana passou a ser considerada doença emergente (12, 13), notadamente para pacientes severamente comprometidos, especialmente os acometidos pelo vírus da imunodeficiência adquirida (Aids).

A rodococose humana apresenta manifestação clínica grave de pneumonia granulomatosa abscedante, cavitária, de difícil resolução terapêutica. A transmissão de *R. equi* dos animais domésticos (incluindo os suínos) para os humanos ainda é controversa. Geralmente deriva do contato direto com animais, da inalação de aerossóis no ambiente das criações, ou por lesões transcutâneas (14, 15). Cerca de 30% dos pacientes imunocomprometidos acometidos por rodococose, possuem histórico de contato com animais domésticos, sugerindo que essa proximidade favoreça a transmissão de *R. equi* para os humanos (14, 16, 17).

Apesar da similaridade entre a virulência de linhagens de *R. equi* isoladas de pacientes com Aids e de suínos, não está completamente esclarecido o papel desta espécie animal como fonte de *R. equi* para os humanos, tampouco para outros animais, ou mesmo na contaminação ambiental com linhagens detentoras de plasmídios associados à virulência (18).

Estudos recentes na Tailândia e Brasil têm sugerido que o consumo de carne crua ou mal passada de suínos, poderia servir como via de transmissão de linhagens patogênicas de *R. equi* dos suínos para humanos, particularmente para pacientes que não tem histórico de contato com criatórios de suínos (17, 19).

A dificuldade de diferenciar, nos abatedouros, os micro-organismos envolvidos na gênese da linfadenite infecciosa suína, somado ao risco zoonótico dos patógenos e ao prejuízo com o descarte de carcaças, reforçam a necessidade da vigilância sanitária continuada no controle da linfadenite infecciosa em suínos. O crescente isolamento de *R. equi* e espécies do gênero *Mycobacterium* em pacientes imunocomprometidos (particularmente acometidos pela Aids), intensificaram a vigilância da linfadenite infecciosa em suínos, posto que estes micro-organismos figuram dentre as principais causas da doença. São preocupantes também os riscos de transmissão para os humanos pelo contato direto com suínos, pelo ambiente dos criatórios ou ainda pelo consumo de produtos e subprodutos de origem suína (6, 20, 21).

O presente estudo revisou os principais aspectos da rodococose em suínos, com ênfase nas propriedades de virulência de *R. equi*, nos achados epidemiológicos e nos aspectos de Saúde Pública.

REVISÃO DA LITERATURA

Etiologia e propriedades gerais

A rodococose é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria *R. equi*, anteriormente denominada *Corynebacterium equi*. O gênero *Rhodococcus* pertence à ordem *Actinomycetales*, família *Nocardiaceae* (22).

São bactérias intracelulares facultativas, oportunistas, caracterizadas pelo desenvolvimento de lesões piogranulomatosas nos animais, devido à habilidade de sobreviver e se multiplicar no interior dos macrófagos. Apresentam-se sob a forma de cocos bacilos ou organismos pleomórficos, de 1 a 5 µm, Gram-positivos. São catalase-positivos, oxidase-negativos, fracamente ácido-resistentes, isolados a partir de 48-72 horas de cultivo, sob condições de aerobiose, a 37°C, em meios convencionais como o ágar acrescido de sangue ovino ou bovino (5%) desfibrinado. As colônias são tipicamente mucóides, não hemolíticas que, no primo isolamento, apresentam tonalidade brancoacinzentada e, posteriormente, assumem coloração salmão (6, 22).

Para o isolamento de *R. equi* a partir de materiais contaminados como fezes ou solo, deve-se utilizar meios de cultivo seletivos, como os meios de NANAT (ácido nalidíxico, novobiocina, actidione e telurito de potássio), CAZ-NB (ceftazidima, novobiocina e actidione), TCP (trimetoprim, cefoperazone, polimixina B, actidione e telurito de potássio) e TVP (trimetoprim, vancomicina, polimixina B, nistatina e telurito de potássio). Estes meios

contêm antimicrobianos que inibem micro-organismos contaminantes e favorecem o isolamento de *R. equi* (23-25).

São reconhecidas varias espécies de *Rhodococcus*, diferenciadas pela diversidade de metabolismo, das quais apenas *R. equi* é patogênica para os mamíferos (26).

R. equi esta amplamente distribuído no ambiente. O micro-organismo é isolado de grande variedade de fontes incluindo diferentes tipos de solos, pedras, bem como das fezes e intestino de animais doentes e sadios (27). Devido ao habitat predominantemente telúrico, apresenta requerimentos nutricionais simples, facilmente supridos pelas fezes dos animais (principalmente de equinos e herbívoros), devido à riqueza em ácidos orgânicos voláteis (24). Apresenta elevada resistência no meio ambiente, mantendo-se viável por até 12 meses em fezes de herbívoros ou no solo, mesmo exposto à condições extremas de temperatura e pH (28). Possui, também, relativa resistência a certos produtos químicos como ácido oxálico (2,5%) e ácido sulfúrico (5%), por 60 a 45 minutos (29), respectivamente.

A virulência de *R. equi* está relacionada com a capacidade do micro-organismo de inibir a fusão do fagolisossomo e de se multiplicar no interior de fagócitos (neutrófilos e macrófagos), resistindo à eliminação pulmonar, hepática e esplênica. A dificuldade dos humanos e animais susceptíveis em resolver os processos inflamatórios decorrentes da infecção por *R. equi*, deve-se também a diferentes mecanismos de evasão do sistema imune associados aos fatores de virulência da bactéria, como a presença de cápsula polissacarídica, do ácido micólico, e das enzimas colesterol oxidase e fosfolipase C (14, 22).

O ácido micólico da parede celular de *R. equi* é composto de 30-54 unidades de carbono, diferentemente do gênero *Corynebacterium*, composto por 22-38 unidades, assim como do gênero *Mycobacterium* com 60-90 unidades de carbono. Quanto maior a cadeia de carbono, maior é a dificuldade de formação do fagolisossomo e inativação do agente (29, 30).

O “fator equi”, também considerado fator de virulência nas linhagens de *R. equi*, é determinado por exoenzimas (colesterol oxidase e a fosfolipase C), que possuem atividade lítica para células e tecidos do hospedeiro devido a acentuada atividade membranolítica (31). A produção destas enzimas pode ser visualizada no teste clássico de “Camp”, no qual a semeadura perpendicular de linhagem de *R. equi* em meio de ágar-sangue ovino ou bovino (5%) desfibrinado, frente à cepa beta hemolítica de *Staphylococcus aureus*, resulta em hemólise sinérgica na interseção da semeadura, formando uma “ponta de seta”. Este fenômeno ocorre pelo efeito sinérgico da ação das exoenzimas de *R. equi* (que promovem a destruição das fosfolipases das membranas dos eritrócitos) e a beta hemolisina de *Staphylococcus aureus*, resultando em hemólise. A liberação do íon ferro dos eritrócitos é considerado importante cofator na multiplicação bacteriana (32). Entretanto, não está completamente esclarecido o impacto do “fator equi” na patogenicidade do agente, uma vez que podem estar presentes em isolados virulentos ou não (33). Pei et al. (34) demonstraram que a exoenzima colesterol oxidase (gene *choE*) não é essencial para a virulência de *R. equi*, visto que linhagens mutantes do micro-organismo, com deleção do gene que codifica a proteína *choE*, permaneceram virulentas para camundongos e em potros infectados experimentalmente.

Nas ultimas décadas, a virulência de *R. equi* isolada de animais e humanos tem sido atribuída a presença de antígenos e plasmídeos associados à virulência (Vap's). Até o momento são conhecidos três níveis de virulência: virulentos, de virulência intermediária e avirulentos. Os isolados virulentos e de virulência intermediária são caracterizados pela presença de antígenos associados à virulência VapA (15 a 17kDa) e VapB (20kDa), respectivamente. As estirpes avirulentas são desprovidas de plasmídios e antígenos virulentos (não apresentam os genes *vapA* ou *vapB*) (35).

As linhagens VapA são isoladas predominantemente de potros com pneumonia e menos frequentemente de humanos (35, 36), enquanto as linhagens VapB são isoladas com maior

frequência em linfonodos de suínos e em pacientes infectados com o vírus da Aids. As estirpes avirulentas são comumente isoladas do ambiente dos criatórios de equinos e herbívoros, de humanos com ou sem imunossupressão e da areia de parques e praças de recreação humana (12, 21, 35, 37).

Os plasmídeos virulentos que codificam VapA são representados por 11 tipos clássicos e apresentam distribuição geográfica distinta. Os plasmídios 85kb tipo I e 87kb tipo I são encontrados na América do Sul, Austrália e Europa, enquanto o 85 kb tipo II é encontrado exclusivamente na França. Nos EUA particularmente no Texas, são observadas linhagens detentoras de plasmídios 85 kb tipo III e IV. No Japão são detectados os plasmídios 87 kb tipo II e 90 kb tipos I a V (13, 35, 38, 39).

As estirpes de virulência intermediária contém plasmídeos de 79-100kb, que detêm genes que expressam antígenos de 20kDa (VapB) (35). Até o momento são reconhecidos 29 tipos de plasmídeos de virulência intermediária, encontrados principalmente em linhagens de origem suína e em humanos (18, 25, 37).

Estudos realizados na Hungria com 82 linhagens de javalis revelaram 21 linhagens VapB, das quais o tipo 5 foi predominante (37). De maneira similar, estudo recente conduzido no Brasil investigando 60 linfonodos de javalis, com e sem linfadenite, revelou quatro linhagens VapB do tipo 8 (19).

Estirpes avirulentas têm sido encontradas em vários países acometendo humanos, com e sem imunossupressão. Estas estirpes não apresentam plasmídeos que expressam a produção de proteínas de 15 a 17kDa (VapA) ou de 20kDa (VapB) (35).

A produção dos plasmídios associadas à virulência de *R. equi* revelou a presença de uma “ilha de patogenicidade” contendo nove genes protéicos associados à virulência. Os genes Vap's (Virulence associated protein) foram denominados (*vapA, B, C, D, E, F, G, H, I*) (40). Os genes *vapC, vapD* e *vapE* apresentam, estruturalmente, 50% de similaridade com os genes *vapA* e *vapB*. Jain, Bloom e Hondalus (41) demonstraram que linhagens de *R. equi* que não expressavam o plasmídio de virulência, eram incapazes de sobreviver e multiplicar-se no interior de macrófagos, mostrando-se avirulentas para potros e camundongos.

Infecções em Suínos por *R. equi*

A linfadenite infecciosa figura dentre as afecções mais preocupantes na criação de suínos, em virtude dos prejuízos gerados aos produtores e/ou as indústrias com a condenação de carcaças, devido ao potencial zoonótico dos agentes causais (5, 13).

A etiologia da linfadenite infecciosa em suínos é complexa, causada principalmente por *Mycobacterium* spp. e *R. equi*, seguido em menor frequência por *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *pyogenes*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e enterobactérias (6, 8, 14, 42).

A via oral é a principal forma de infecção nos suínos na ocorrência das linfadenites infecciosas por *R. equi*. A transmissão ocorre pelo contato dos animais com o micro-organismo no meio ambiente, principalmente em criatórios com excesso de sujidades e matéria orgânica. O micro-organismo é encontrado também contaminando camas de palha, serragem e maravalha, eliminado pelas fezes de animais. O predomínio da infecção por via oral pode justificar o maior acometimento dos linfonodos submandibulares e, secundariamente, mesentéricos e mediastínicos. No entanto, *R. equi* tem sido isolado também de linfonodos aparentemente saudáveis de suínos (6, 14, 21, 43).

Nos suínos, a infecção por *R. equi* geralmente é restrita ao trato linfático dos animais. A linfadenite é a principal manifestação clínica da rodococose nos suínos. São encontradas lesões preferencialmente nos linfonodos retrofaríngeos, submandibulares, mesentéricos e mediastínicos, comumente identificados apenas no momento do abate (14). Os linfonodos

acometidos exibem diferentes graus de hipertrofia, apresentando-se lobulados, mostrando ao corte lesões necrótico-purulentas, focais ou generalizadas, de tonalidade brancoamarelada, podendo ou não apresentar calcificação (21, 30, 43).

As lesões (pio)granulomatosas também chamadas “tuberculóides” na rodococose em suínos são assintomáticas, provavelmente em virtude do abate dos animais relativamente jovens, entre 120 a 150 dias de idade, não havendo tempo hábil para a generalização. Desta forma, ocorrem principalmente lesões focais, restritas aos linfonodos regionais (5, 21, 43). Ocasionalmente são observados abscessos orais e pneumonia em leitões e animais adultos (44).

Prescott (14) afirmou que os suínos são considerados reservatórios de *R. equi*, visto que o micro-organismo é isolado de linfonodos e das fezes de animais assintomáticos.

De acordo com a legislação brasileira, regida pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA), as carcaças de suínos com lesões granulomatosas em linfonodos, devem receber julgamento equivalente ao da tuberculose “clássica” (45). Silva et al. (46) referiram que se forem encontrados dois ou mais focos de lesões granulomatosas, sem sinais de generalização em linfonodos do sistema digestório, determina-se o cozimento da carne à temperatura de 76,7°C por 30 minutos. No entanto, caso apresente somente um foco lesional, como linfonodos da cabeça ou do intestino delgado, a região é condenada e a carcaça liberada, sem restrições.

As lesões em linfonodos causadas por *Mycobacterium* spp., *R. equi*, *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *pyogenes*, estafilococos, estreptococos e enterobactérias, são praticamente indistinguíveis macroscopicamente no momento do abate. Assim, o cultivo microbiológico permanece como o método mais fidedigno para o diagnóstico de rotina da rodococose suína. Recentemente, as técnicas moleculares tem se mostrado promissoras no diagnóstico das infecções por *R. equi* em suínos, particularmente na confirmação da virulência dos isolados (17, 35).

Não existem medidas específicas para a profilaxia/controle da rodococose em suínos, visto que o micro-organismo está amplamente distribuído no ambiente dos animais. Na prática, também não se recomenda o tratamento da doença, provavelmente devido às infecções se restringirem ao trato linfático, não havendo disseminação para outros órgãos, ou mesmo sinais clínicos aparentes na grande maioria dos animais, aliado ao abate precoce dos suínos, com cerca de 150 dias (36).

Virulência de *R. equi* em suínos

Nas últimas décadas, o perfil de virulência das linhagens de *R. equi* isolados de suínos tem sido motivo de investigações em vários países. No Japão, Takai (35) referiu o predomínio de plasmídios de virulência intermediária (VapB) em isolados de *R. equi* recuperados de linfonodos de suínos e a similaridade deste perfil com linhagens isoladas de humanos com Aids. Em 56 linhagens de *R. equi* isoladas de 1832 linfonodos de suínos sem lesões aparentes abatidos no Japão, foram identificadas 54 estirpes produtoras de VapB e duas de VapA (18). Madarame et al. (47) também no Japão, identificaram 5,5% de estirpes de *R. equi* virulentas e de virulência intermediária em 1615 linfonodos de suínos.

Pate et al. (48) cultivaram 260 linfonodos de suínos com lesões granulomatosas obtidos em abatedouro na Eslovênia, identificando 123 (47,3%) isolados de *Mycobacterium avium* e 71 (27,3) de *R. equi*. Cerca de 60% dos isolados de *R. equi* apresentaram antígenos de virulência intermediária (VapB), enquanto os demais foram avirulentos.

Na Holanda, Komijn et al. (49) investigaram a etiologia bacteriana da linfadenite infecciosa em suínos em 1276 linfonodos. Destes, 98 (7,7%) mostraram lesões submandibulares por *R. equi* e apenas um (0,1%) em linfonodo mesentérico. Os autores

ressaltaram neste estudo o predomínio de isolamentos de *R. equi* em comparação ao gênero *Mycobacterium*.

Na Hungria, dentre 1173 linfonodos submandibulares de suínos sem lesões aparentes obtidos de abatedouro, foram isolados 164 estirpes de *R. equi*. Destas, 44 (26,8%) apresentaram plasmídios de virulência intermediária (VapB), com predomínio do tipo 5 (25). Na Eslovênia, Pate et al. (50) descreveram que dentre 30 estirpes de *R. equi* recuperadas de linfonodos de suínos, nove apresentaram antígenos de virulência intermediária (VapB), com maior prevalência também de plasmídios tipo 5 (95Kb).

No Brasil, Lara et al. (10) identificaram 31 (24,1%) isolados de *Mycobacterium* spp. e 17 (13,2%) de *R. equi*, em 129 amostras de linfonodos de suínos destinados ao abate, que apresentavam lesões (pio)granulomatosas. Ribeiro et al. (11) investigaram o perfil de virulência plasmidial em 19 isolados de *R. equi*, identificados em linfonodos de suínos de abatedouros do interior do estado de São Paulo, dos quais 12 linhagens apresentaram antígenos de virulência intermediária (VapB) com predomínio o tipo 8 (oito linhagens), duas tipo 10, uma do tipo 1e outra do tipo 29, enquanto as demais foram consideradas avirulentas. Estes resultados reforçam o predomínio de linhagens de virulência intermediária obtidas de linfonodos de suínos, apesar das diferenças dos tipos de VapB encontrados nos vários países.

Estudos envolvendo a epidemiologia molecular das linhagens de *R. equi*, podem contribuir no esclarecimento do impacto desta espécie na transmissão de isolados patogênicos para os humanos em diferentes regiões geográficas. No entanto, apesar das evidências em vários países da similaridade do perfil de virulência (VapB) de linhagens de *R. equi* isoladas de linfonodos de suínos e de humanos (com e sem Aids) não está esclarecida a importância desta espécie doméstica como fonte de infecção de isolados patogênicos para os humanos e outros animais (11, 18, 19, 47).

Infecções em humanos por *R. equi*

Golub, Falk e Spink (51) nos EUA, relataram o primeiro caso de rodococose em humanos, em paciente de 29 anos de idade que apresentava abscessos pulmonares, tratado há mais de 10 anos com corticoides devido à hepatite crônica. Porém, nas décadas subsequentes, as infecções em humanos foram caracterizadas como raras (52). Nos últimos anos, tem-se experimentado o incremento de doenças consideradas emergentes e re-emergentes em humanos, com destaque para a rodococose e a tuberculose, respectivamente, fato que tem gerado preocupação na área médica (6, 12).

Pacientes pertencentes a determinados grupos de vulnerabilidade (grupo de risco), que apresentam diferentes graus de imunossupressão ou debilidade orgânica, como hepatopatas, transplantados, alcoólatras, acometidos de neoplasias (leucemia, linfoma), usuários de drogas injetáveis e, principalmente, infectados pelo vírus da Aids, são mais susceptíveis a infecção por *R. equi*. No entanto, a rodococose em indivíduos imunocompetentes também pode ocorrer, embora sejam raros os registros (16).

O relatório anual do Programa das Nações Unidas sobre HIV/Aids reportou que, em 2011, aproximadamente 34 milhões de pessoas estavam infectadas com o vírus da Aids em todo mundo. No mesmo ano, 2,5 milhões de novos casos foram relatados. Destes, 1,7 milhões evoluíram para óbito em decorrência da doença e de infecções oportunistas. Na Europa, o número de pessoas infectadas com o vírus da Aids em 2010 atingiu 1,4 milhões de pessoas, com 118 mil novos casos somente neste ano. A estimativa de indivíduos HIV-positivos no ano de 2011 na África do Sul foi de 5,38 milhões, caracterizando a região com o maior número de pessoas infectadas em todo mundo, representando 22,5 milhões de pessoas (53).

Estima-se que 1,8 milhão de pessoas estejam infectadas pelo vírus da Aids na América Latina, dos quais 51% dos HIV-positivos recebem tratamento (54).

No Brasil, entre 1980 e 2009 foram notificados 592.914 casos de Aids, com cerca de 20 casos/100 mil habitantes. Somente em 2009, foram notificados 38.538 novos casos da doença (55). O avanço no número de pessoas infectadas com o vírus da Aids encontra reflexo direto no aumento de doenças consideradas emergentes e re-emergentes, causadas predominantemente por agentes oportunistas. Neste contexto, inclui-se a rodococose (36).

A transmissão da rodococose para os humanos ainda é objeto de controvérsia entre os pesquisadores. No entanto, a exposição a solos contaminados com *R. equi* é considerada a principal forma da infecção para os humanos, decorrente da inalação de aerossóis contaminados com a bactéria. A infecção pode ocorrer também pela via digestória, mediante a deglutição da própria saliva de pacientes com infecção respiratória, ou mesmo a ingestão de alimentos contaminados (14, 29, 52).

Indivíduos que trabalham em fazendas, em manutenção de jardins e expostos a equinos, tendem a apresentar maior risco de contrair a infecção (56). Doig, Gill e Church (16) relataram o perfil de 18 casos de rodococose em humanos no Canadá, dos quais oito (44,4%) pacientes apresentavam histórico de contato recente com ambiente rural (limpeza de estábulos, baias e/ou piquetes) e/ou com animais de fazenda, especialmente equinos.

Prescott (14) relatou que de 32 pacientes com rodococose coinfectados com o vírus HIV, 12 indivíduos tinham histórico de contato estreito com animais e/ou ambientes de criação de espécies domésticas, demonstrando o risco ocupacional na transmissão da rodococose para humanos. Levantamento epidemiológico de 12 casos de rodococose humana no Canadá, dos quais seis acometidos por Aids, revelou que dois pacientes tinham histórico de contato com equinos, um com cão e outro com ambiente rural (56). Watanabe et al. (57) descreveram que a maioria dos casos de pacientes HIV-positivos coinfectados por *R. equi*, residem próximos a propriedades rurais ou são agricultores, fato que facilitaria o contágio com o agente mediante ao contato com animais e/ou o meio ambiente. O histórico do contato de pacientes com rodococose – com e sem Aids –, com animais domésticos e/ou ambiente rural, reforçam o potencial da rodococose como doença ocupacional (56).

As manifestações clínicas apresentadas por pacientes com rodococose são caracterizadas por quadros respiratórios como tosse e dispnéia, devido às lesões pulmonares abscedantes e cavitárias. Estes quadros são mais complicados em pacientes portadores do vírus da Aids (57). A taxa de mortalidade causada por *R. equi* é em torno de 11% para pacientes imunocompetentes e entre 20 a 55% em indivíduos imunossuprimidos, particularmente em indivíduos coinfectados com o vírus da Aids. A recidiva nestes pacientes é comum, independentemente do tratamento instituído (12).

O primeiro caso de rodococose em paciente com Aids foi descrito em 1986. A partir deste ano, 228 novos casos de rodococose foram descritos em pacientes HIV-positivos, dentre os quais 210 sob a forma de pneumonia com cavitação (58).

Ferretti et al. (42) na Itália, relataram dois casos de rodococose pulmonar e encefálica em mulheres coinfectadas com o vírus da imunodeficiência adquirida.

As manifestações extra-pulmonares causadas por *R. equi* em humanos incluem diarreia sanguinolenta, caquexia, pleurisia, hepatopatias, abscessos renais, peritonite, artrite séptica, osteomielite, linfadenite e meningite. O diagnóstico é obtido a partir do isolamento do agente principalmente utilizando lavados traqueo-brônquicos, sangue, material de biópsia de órgãos, fluidos de abscessos e cateteres intravenosos (14, 52). Exames de diagnóstico por imagem (raios-x, tomografia e ressonância magnética) da região torácica, mostram lesões nodulares, particularmente em lobos pulmonares superiores (6).

Verville et al. (56) investigaram 12 casos de rodococose em pacientes humanos coinfectados com o vírus da Aids. A doença foi fatal em quatro pacientes e evoluiu cronicamente em outros dois.

O tratamento da rodococose humana depende da eficiência dos antimicrobianos em atingir altas concentrações no interior das células. Em alguns casos tem sido recomendada a remoção cirúrgica da região acometida. *R. equi* é sensível “in vitro” aos antimicrobianos pertencentes ao grupo dos macrolídeos (eritromicina, azitromicina), a rifampicina, vancomicina, bem como outros fármacos como sulfonamidas/trimetoprim, aminoglicosídeos e fluorquinolonas (14, 56, 59). O tratamento deve ser realizado até a remissão completa dos sinais e sintomas, e após culturas microbiológicas negativas. Entretanto, recidivas e complicações clínicas são frequentes em humanos (52).

Virulência de *R. equi* em humanos

Recentemente, têm-se preocupado em caracterizar o perfil de virulência de estirpes de *R. equi* isoladas de pacientes humanos – em especial os acometidos de Aids – utilizando os plasmídios associados à virulência como marcadores da patogenicidade. Takai et al. (17) relataram, na Tailândia, a patogenicidade de seis isolados de *R. equi*, todos provenientes de pacientes HIV- Positivos, dos quais quatro apresentavam virulência intermediária tipo 5, enquanto os demais foram avirulentos.

Makrai et al. (13) descreveram, na Hungria, que dentre sete estirpes de *R. equi* isoladas de pacientes com Aids, cinco continham antígenos de virulência intermediária tipo 5, semelhante ao padrão plasmidial de virulência de estirpes encontradas em linfonodos de suínos. De maneira similar, Takai et al. (17) detectaram o mesmo perfil de virulência (VapB) em *R. equi* obtidos de linfonodos submandibulares de suínos aparentemente saudáveis e de pacientes humanos com rodococose na Tailândia.

No Brasil, o primeiro caso de rodococose em paciente humano foi descrito em homem HIV-positivo, que apresentava sintomatologia pulmonar. A caracterização dos antígenos de virulência da linhagem de *R. equi* deste paciente acusou a produção de VapB (20kDa) (60).

Ribeiro et al. (11) investigaram recentemente no país o perfil de virulência de 20 estirpes de *R. equi* isoladas de humanos. Destes, nove eram HIV-positivos. Das 20 estirpes onze foram avirulentas, quatro VapA (três 87Kb tipo I e um 85 Kb tipo I) e cinco VapB tipo 8. As estirpes VapB são comumente encontradas em suínos com linfadenite granulomatosa. Curiosamente, nenhuma destas pessoas tinha histórico de contato com suínos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ampla distribuição de *R. equi* no ambiente dificulta sobremaneira o controle da infecção nos suínos. Ademais, o abate de suínos no Brasil é motivo de preocupação para os órgãos de vigilância sanitária, em virtude dos riscos do consumo de carne e derivados oriundos de criatórios de baixa tecnificação e/ou de exploração familiar. Esta prática, sem o rigor da inspeção sanitária de produtos de origem animal, expõe a população aos riscos do consumo de carne e derivados suínos contendo micro-organismos reconhecidamente patogênicos para os humanos, como *R. equi*, particularmente em indivíduos debilitados ou acometidos por doenças imunossupressivas como a Aids.

Apesar da similaridade do perfil de virulência (VapB) de estirpes isoladas de pacientes HIV-positivos e de linfonodos de suínos, não está esclarecido o impacto desta espécie animal como fonte de infecção para os humanos (18). São incipientes ainda os estudos no Brasil visando a detecção da virulência de estirpes de *R. equi* isoladas de suínos (39). No entanto, estudo na Tailândia (17) e investigação recente no Brasil (19) postularam que a transmissão de *R. equi* dos suínos para os humanos possa ocorrer pelo consumo de carne crua ou mal cozida de suínos, contaminada de forma cruzada pela bactéria dos próprios linfonodos (linha de abate) ou pelas fezes dos animais.

REFERÊNCIAS

1. Roppa L. Brasil: o consumo de carnes passado a limpo. *Porkworld*. 2008;43:17-20.
2. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora da Carne Suína - ABIPECS. Carne suína brasileira [Internet]. São Paulo; 2011 [acesso 2012 Ago 15]. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/home.html>
3. Saad MSM, Neves MF. O mercado da carne suína no Brasil. *Porkworld*. 2011;65:30-4.
4. Machado J. Carne suína: balanço 2011 e perspectivas para 2012. *Porkworld*. 2012;66:28-9.
5. Silva VS, Morés N, Dutra VD, Ferreira-Neto JS, Saad MHF. Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium-intracellulare* em suínos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2000;52:562-6.
6. Acha PN, Szyfres B. Rodococosis. In: Zoonoses y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª ed. Washington: Organizacion Panamericana de la Salud; 2003. vol. 1, p.266-83.
7. Martins LS. Epidemiologia e controle das micobacterioses em suínos no sul do Brasil: estimativa do impacto econômico e estudo da sazonalidade [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2001.
8. Langenegger CH, Langenegger J. Prevalência e distribuição de dos sorotipos de micobactérias do complexo MAIS isoladas de suínos no Brasil. *Pesqui Vet Bras*. 1981;1:75-80.
9. Lara GHB, Ribeiro MG, Guazzelli A, Fernandes MC. Linfadenite infecciosa em suínos: Etiologia, epidemiologia e aspectos em Saúde Pública. *Arq Inst Biol*. 2009;76:317-25.
10. Lara GHB, Ribeiro MG, Leite CQF, Paes AC, Guazzellia A, Silva CAV, et al. Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). *Res Vet Sci*. 2011;90:185-8.
11. Ribeiro MG, Lara GHB, Takai S, Guazzellia A, Silva CAV, Fernandes MC, et al. Virulence genes and plasmid profile in *Rhodococcus equi* isolates from domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. *Res Vet Sci*. 2011;91:478-81.
12. Linder R. *Rhodococcus equi* and *C. haemolyticum*: Two “Coryneform” bacteria increasingly recognized as agents of human infection. *Emerg Infect Dis*. 1997;3:1-10.
13. Makrai L, Takai S, Tamura M, Tsukamoto A, Sekimoto R, Sasaki Y, et al. Characterization of virulence plasmids in *R. equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. *Vet Microbiol*. 2002;88:377-84.
14. Prescott JF. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 1991;4:20-34.

15. Adal KA, Shiner PT, Francis JB. Primary subcutaneous abscess caused by *Rhodococcus equi*. Ann Intern Med. 1995;122:317.
16. Doig C, Gill MJ, Church DL. *Rhodococcus equi*—an easily missed opportunistic pathogen. Scand J Infect Dis. 1991;23:1-6.
17. Takai S, Tharavichitkul P, Sasaki C, Onishi Y, Yamano S, Kakuda T, et al. Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with acquired immune deficiency syndrome and prevalence of virulent *R. equi* in soil collected from domestic animal farms in Chiang Mai, Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2002;66:52-5.
18. Takai S, Fukunga N, Ochiai S, Imai Y, Sasaki Y, Tsubaki S, et al. Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. J Clin Microbiol. 1996;34:1034-7.
19. Ribeiro MG, Takai S, Vargas AC, Mattos GAL, Camello TCF, Ohno R, et al. Identification of virulence associated plasmids in *Rhodococcus equi* in humans with and without acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2011;85:510-3.
20. Kiehn TE, Edwards FF, Brannon P, Tsang AY, Maio M, Gold JW, et al. Infections caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests, and morphological and seroagglutination characteristics. J Clin Microbiol. 1985;21:168-73.
21. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Diseases of swine. 10th ed. Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2012.
22. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Rhodococcus equi*. In: Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed; 2005. p.71-3.
23. Woolcock JB, Farmer AMT, Mutimer MD. J Clin Microbiol. 1979;9:640-2.
24. Meijer WG, Prescott JF. *Rhodococcus equi*. Vet Res. 2004;35:383-96.
25. Makrai L, Takaima S, Dénes B, Hajtós I, Kakuda Y, Tsubaki S, et al. J Clin Microbiol. 2005;43:1246-50.
26. Prescott JF. *Rhodococcus equi*. In: Prescott CL, Thoen CO, Prescott JF, Songer J, editors. Pathogenesis of bacterial infections of animals. 3rd ed. Ames: Blackwell Publishing; 2004.
27. Bell KS, Philp JC, Aw DWJ, Christofi N. The genus *Rhodococcus*. J Appl Microbiol. 1998;85:195-210.
28. Benoit S, Benachour A, Taouji S, Auffray Y, Hartke A. H₂O₂, which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. Infect Immun. 2002;70:3768-76.
29. Hirsh DC, Zee YC. Microbiologia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.

30. Krewer CC, Costa MM, Schrank I, Vargas AC. *Rhodococcus equi*. Arq Inst Biol. 2008;75:533-45.
31. Machang'u RS, Prescott JF. Role of antibody to extra cellular proteins of *Rhodococcus equi* in protection against *R. equi* pneumonia in foals. Vet Microbiol. 1991;26:323-33.
32. Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JAN. Microbiologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 1999.
33. Takai S, Ikeda T, Sasaki Y, Watanabe Y, Ozawa T, Tsubaki S, et al. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15-to 17-kilodalton antigens. J Clin Microbiol. 1995;33:1624-7.
34. Pei Y, Dupont C, Sydor T, Haas A, Precott JF. Cholesterol oxidase (ChoE) is not important in the virulence of *Rhodococcus equi*. Vet Microbiol. 2006;118:240-6.
35. Takai S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. Vet Microbiol. 1997;56:167-76.
36. Ribeiro MG. Fatores de virulência em linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de equinos, suínos e humanos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2008.
37. Makrai L, Kobayashi A, Matsuoka M, Sasaki Y, Kakuda T, Dénes B, et al. Isolation and characterisation of *Rhodococcus equi* from submaxillary lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*). Vet Microbiol. 2008;131:318-23.
38. Tkachuk-Saad O, Prescott JF. *Rhodococcus equi* plasmids: isolation and partial characterization. J Clin Microbiol. 1991;29:2696-700.
39. Yuyama T, Yusa S, Yoshizumi K, Yamano S, Murata S, Hirose T, et al. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* in thoroughbred horses in Kagoshima. J Vet Med Sci. 2002;64:715-8.
40. Russell DA, Byrne GA, O'Connell EP, Boland CA, Meijer WG. The LysR-type transcriptional regulator VirR is required for expression of the virulence gene vapA of *Rhodococcus equi* ATCC 33701. J Bacteriol. 2004;186:5576-84.
41. Jain S, Bloom BR, Hondalus MK. Deletion of vapA encoding virulence associated protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. Mol Microbiol. 2003;50:115-28.
42. Ferretti F, Boschini A, Iabichino C, Gerevini S, De Nardi P, Guffanti M, et al. Disseminated *Rhodococcus equi* infection in HIV infection despite highly active antiretroviral therapy. BMC Infect Dis. 2011;11:343.
43. Sobestiansky J, Barcellos DESN. Doenças dos suínos. Goiânia: Canone; 2007.
44. Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. Diseases of swine. 9ª ed. Ames: Blackwell Publishing; 2006.

45. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal e outras legislações de interesse do DIPOA/SDA. Brasília: MAPA; 2007.
46. Silva VS, Morés N, Amaral AL, Ventura L, Yamamoto MT, Pereira MAC. Dinâmica da infecção causada por *Mycobacterium avium* em suínos. In: Avaliação do critério de julgamento e destino das carcaças acometidas. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves; 2002. p.1-6.
47. Madarame H, Yaegashi R, Fukunga N, Matsukuma M, Mutoh K, Morisawa N, et al. Pathogenicity of *Rhodococcus equi* strains possessing virulence-associated 15 to 17 kDa antigens: experimental and natural cases in pigs. J Comp Pathol. 1998;119:397-405.
48. Pate M, Zdovc I, Pirs T, Krt B, Ocepek M. Isolation and characterisation of *Mycobacterium avium* and *Rhodococcus equi* from granulomatous lesions of swine lymph nodes in Slovenia. Acta Vet Hung. 2004;52:143-50.
49. Komijn RE, Wisselink HJ, Rijsman VMC, Stockhofe-Zurwieden N, Bakker D, Van Zijderveld FG, et al. Granulomatous lesions in lymph nodes of slaughter pigs bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*. Vet Microbiol. 2007;120:352-7.
50. Pate M, Ocepek M, Zdovc I, Minato C, Ohtsu Y, Matsuoka M, et al. Intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs in Slovenia: discovery of new plasmid types and assessment of genetic diversity by pulsed-field gel electrophoresis. Vet Med. 2009;54:111-7.
51. Golub B, Falk G, Spink WW. Lung abscess due to *Corynebacterium equi* – report of first human infection. Ann Intern Med. 1967;66:1174-6.
52. Severo LC, Londero AT. Rodococoses. In: Veronesi R, Focaccia R. Tratado de infectologia. São Paulo: Atheneu; 1996. p.1032-3.
53. Moribe P. Com 5,4 milhões de soropositivos, Aids recua na África do Sul [Internet]. Africa do Sul; 2011 [acesso 2012 Jun 27]. Disponível em: <http://www.portugues.rfi.fr/tag/africa-do-sul?page=2>
54. Organização Mundial da Saúde. Casos de Aids aumentaram na América Latina, segundo OMS [Internet]. 2011 [acesso 2012 Jun 27]. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude>
55. Mazin R. Trinta anos de HIV/AIDS na América Latina [Internet]. 2011 [acesso em 2011 Jun 28]. Disponível em: <http://infosurhoy.com/cocoon/saii/features/society/2011/06/28/feature-01>
56. Verville TD, Huycke MM, Greenfield RA, Fine DP, Kuhls TL, Slater LN. *Rhodococcus equi* infections in humans. Medicine. 1994;73:119-32.

57. Watanabe H, Asoh N, Kobayashi S, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, et al. Clinical and microbiological characteristics of community- acquired pneumonia among human immunodeficiency vírus- infected patients in northern Thailand. J Infect Chemother. 2008;14:105-9.
58. Ibarra R, Jinkins JR. Severe otitis and mastoiditis due to *Rhodococcus equi* in a patient with AIDS. Case report. Neuroradiology. 1999;41:699-701.
59. Tavares W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2002.
60. Caterino-de-Araújo A, De Los Santos-Fortuna E, Zandona-Meleiro MC, Calore EE, Perez Calore NM. Detection of the 20-kDa virulence-associated antigen of *Rhodococcus equi* in malakoplakia lesion in pleural tissue obtained from an AIDS patient. Pathol Res Pract. 2000;196:321-7.

Recebido em: 21/11/2012

Aceito em: 10/12/2013

ARTROPLASTIA TOTAL NÃO CIMENTADA DA ARTICULAÇÃO COXOFEMORAL EM CÃES

Lucia M. Iziqúe Diogo¹
Bruno Watanabe Minto²
Cláudia Valéria Seullner Brandão³

RESUMO

A artroplastia total da articulação coxofemoral é uma opção amplamente aceita no tratamento cirúrgico para displasia coxofemoral grave e outras causas de dor ou disfunção da articulação coxofemoral em cães. A artroplastia não cimentada foi desenvolvida com o objetivo de eliminar as limitações de durabilidade do sistema cimentado. A técnica baseia-se no conceito de fixação biológica e consiste na substituição da articulação coxofemoral com componentes acetabular e femoral, os quais são inicialmente encaixados por pressão em leitos preparados precisamente, de forma a promover estabilidade até a osteointegração completa do implante. O sucesso do procedimento envolve o paciente, a conformação e qualidade do implante e a precisão da elaborada técnica cirúrgica. Os índices de complicação são baixos, especialmente quando comparados aos do procedimento cimentado. Portanto, uma série de considerações e cuidados deve ser tomada para obterem-se resultados correspondentes com a alta taxa de sucesso da técnica. Objetiva-se com o presente trabalho apresentar uma revisão da literatura disponível sobre a utilização das próteses não cimentadas da articulação coxofemoral em cães. Esta técnica mostra-se efetiva no tratamento das disfunções graves da articulação coxofemoral com vantagens significativas quando comparada aos métodos anteriormente descritos.

Palavras-chave: articulação coxofemoral, prótese, fixação biológica, cão, displasia coxofemoral

CEMENTLESS TOTAL HIP ARTHROPLASTY IN DOGS

ABSTRACT

The total hip replacement is widely accepted for the treatment of severe hip dysplasia and other causes of pain or hip dysfunction in dogs. Cementless arthroplasty was developed in order to remove the durability limitations of the cemented system. The concept of this technique is based on the biological fixation. Acetabular and femoral implants are precisely fitted by pressure in a way to promote stability until the osteointegration has been completed. The success of this procedure involves the patient, the conformation of the hip joint, the precision of the implants and the quality of surgical technique. The complication rate is low, specially when it is compared to cemented procedures. Therefore, a number of considerations and care must be taken to obtain results corresponding with the high success rate of the technique. The goal of this study is to present a review of the available literature about the use of uncemented hip prosthesis in dogs. This technique is shown to be effective in the treatment of serious disorders of the canine hip with significant advantages compared to previously described methods.

Keywords: hip joint, prosthesis, biological fixation, dog, hip dysplasia

¹ Graduanda do 5º ano de Medicina Veterinária, FMVZ UNESP Botucatu

² Prof. Ass. Dr. de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, FCAV UNESP Jaboticabal

³ Profª. Adjª. de Cirurgia de Pequenos Animais, FMVZ UNESP Botucatu, Endereço para correspondência.

ARTROPLASTIA TOTAL COXOFEMORAL NO CEMENTADA EN PERROS

RESUMEN

La artroplastia total coxofemoral es una opción ampliamente aceptada para el tratamiento quirúrgico de la displasia coxofemoral grave y otras causas de dolor o disfunción de la articulación de la cadera en perros. La artroplastia no cementada fue desarrollada para eliminar las limitaciones de la durabilidad del sistema cementado. La técnica se basa en el concepto de la fijación biológica y consiste en la sustitución de la articulación coxofemoral con los componentes acetabulares y femorales, que inicialmente están equipados por la presión en las camas preparadas precisamente con el fin de promover la estabilidad para completar la osteointegración del implante. El éxito del procedimiento implica en el paciente, la conformación, la calidad del implante y la precisión de la técnica desarrollada. Las tasas de complicaciones son bajas, especialmente en comparación con el procedimiento de cementado. Por lo tanto, se deben tomar una serie de consideraciones y cuidados para obtener los resultados correspondientes, con una alta tasa de éxito de la técnica. El objetivo de este trabajo fue presentar una revisión de literatura disponible sobre el uso de prótesis no cementadas de la articulación coxofemoral en perros. Esta técnica ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de los trastornos graves de la articulación coxofemoral con ventajas significativas en comparación con los métodos descritos anteriormente.

Palabras clave: prótesis, articulación coxofemoral, fijación biológica, perro, displasia de cadera

INTRODUÇÃO

A artroplastia total do quadril consiste na substituição total da articulação coxofemoral por componentes acetabular e femoral, disponíveis em diversos sistemas e modelos. A técnica tem como objetivo aliviar a dor e melhorar a qualidade de vida do paciente, por meio da promoção do retorno da função articular. Os implantes tornaram-se disponíveis comercialmente para cães em 1974, sendo eles inicialmente desenvolvidos a partir de sistemas cimentados de fixação dos componentes. Apesar do sucesso terapêutico relatado após a utilização destes sistemas, falhas relacionadas ao cimento instigaram o desenvolvimento de um sistema não cimentado, em 1986, o qual tornou-se disponível apenas em 2003.

O sistema não cimentado é baseado na ideologia de fixação biológica e osteointegração. Existem próteses não cimentadas cuja estabilidade inicial é sustentada por parafusos e outras que utilizam o sistema de encaixe por pressão (*“press-fit”*) (Fig. 1). Em ambas, a estabilidade em longo prazo é alcançada com o crescimento interno de tecido ósseo em direção à prótese, promovendo integração dos implantes. O sistema não cimentado mais utilizado atualmente é o da empresa americana Biomedtrix⁴ (BFX®) e, portanto, é nele que está embasada e focada a maioria dos estudos de artroplastia não cimentada em cães (1).

No Brasil, observam-se poucos estudos e relatos da utilização das próteses coxofemorais em cães (2-5).

⁴ Biomedtrix, Booton, NJ, USA, since 1989 < <http://www.biomedtrix.com/index.php> >



Figura 1. Imagem radiográfica em projeção ventro-dorsal. Aspecto final de uma artroplastia total bilateral de quadril, mostrando um implante cuja estabilidade inicial é dada pelo sistema de 'press-fit' (membro direito) e outra por meio de parafuso (membro esquerdo) (1).

REVISÃO DE LITERATURA

Indicações da técnica

As indicações para uma artroplastia total não cimentada são as mesmas da cimentada, incluindo a displasia coxofemoral grave (6), luxação coxofemoral irreduzível ou crônica (7), necrose asséptica da cabeça do fêmur (8), fraturas de cabeça/colo femoral ou acetábulo irreparáveis ou com má união (9) e revisão de excisões de cabeça e colo femorais inadequadas (10).

Há relatos de uso da artroplastia como forma de manutenção do membro de um cão com fibrossarcoma na cabeça femoral (11) e de vários cães com um único membro pélvico que receberam prótese devido a inúmeras outras causas, cujas evoluções clínicas foram favoráveis (12).

Seleção do paciente

A idade do paciente é um fator importante a ser considerado, sendo ideal a realização do procedimento protético em cães esqueleticamente maduros, em decorrência do risco de soltura da placa fisária acetabular, já que a cabeça femoral será removida. A presença de dermatite, otite, infecção do trato urinário e doença periosteal adiam a artroplastia até a resolução do quadro. Animais com afecções neurológicas ou ortopédicas concomitantes envolvendo os membros pélvicos também recebem contraindicação para a artroplastia coxofemoral. Neoplasias, coagulopatias, diabetes mellitus, síndrome de Cushing e doenças imunossupressoras podem representar riscos para o paciente candidato à artroplastia e, portanto devem ser previa e cuidadosamente avaliados (13).

Características para seleção do sistema não cimentado

O sistema não cimentado elimina uma variável que pode contribuir com a falha do implante: o cimento. A soltura asséptica é mais comum em sistemas cimentados e, em casos de infecção, o tratamento sem a retirada do implante é raramente bem sucedido devido à inabilidade dos antimicrobianos alcançarem o cimento poroso avascular que abriga partículas orgânicas. A retirada ou revisão de próteses cimentadas exige remoção de toda a camada de cimento, o que não é uma tarefa fácil (14).

Mesmo com a superior precisão do procedimento que o sistema não cimentado exige, o tempo cirúrgico e conseqüentemente a exposição ao ambiente são reduzidos. Todos os procedimentos e preocupações relacionadas ao cimento são eliminados. Excluindo os casos que não existe prótese não cimentada disponível (Sistemas CFX® Micro & Nano Hip, Biomedtrix), 95% das artroplastias coxofemorais podem ser feitas com o sistema não cimentado (15).

Fatores limitantes para a realização desta técnica são descritos. Fêmures que possuem baixo índice de alargamento femoral (razão entre a largura intracortical ao nível do trocanter menor e da largura intracortical ao nível do istmo), chamados de fêmures “em chaminé”, predispõem a ocorrência de afundamento da prótese não cimentada. Uma tentativa de redução deste risco é a osteotomia em nível mais alto do colo femoral, a fim de se ter mais osso cortical para calcar a haste femoral, (que deverá ser de tamanho maior), entretanto tal manobra pode dificultar muito a redução da articulação protética. Uma alternativa mais simples e segura é a escolha de uma haste cimentada nesses casos (16).

A falta de cobertura dorsal do acetábulo devido ao desgaste por subluxação crônica ou hipoplasia acetabular por luxação congênita é uma grave limitação para artroplastia coxofemoral. Três milímetros de cúpula exposta é seguramente aceitável, de 3 a 5 milímetros já é considerado arriscado e acima de 5 milímetros é desaconselhável. Protrusão iatrogênica da parede acetabular ou proposital como alternativa de falta de cobertura acetabular dorsal é aceitável apenas em sistemas cimentados (17).

Erros técnicos como fresagem exagerada tanto do acetábulo quanto do fêmur resultam em instabilidade dos implantes nos leitos. As opções são colocação de próteses não cimentadas maiores quando não há limitações anatômicas para isso, ou mudança para um sistema cimentado. Na ocorrência de fissuras durante a fresagem femoral também se aconselha a utilização de uma haste cimentada (16).

Implantes: Design e material

Características do material e do design do implante desempenham importante papel na função e longevidade da artroplastia coxofemoral. Baseada no conceito de fixação biológica, a estabilidade inicial do implante não cimentado pode ser feita utilizando-se encaixe por pressão ou por parafusos, tanto na fixação femoral quanto acetabular. Em ambas, a estabilidade em longo prazo é alcançada com o crescimento interno de tecido ósseo em direção à prótese, promovendo osteointegração dos implantes. As variações de tamanhos de implantes disponíveis permitem a utilização dos sistemas em cães pesando entre 2,5 kg e 80 kg. Existem hastes femorais feitas de três principais tipos de ligas metálicas: aço inoxidável, titânio e ligas de cromo-cobalto; sendo os dois últimos os mais utilizados. O titânio possui menor elasticidade, a qual se aproxima mais da elasticidade do osso cortical. Teoricamente isso significa padrões mais previsíveis e fisiológicos de remodelamento ósseo e menor reação de proteção ao estresse, fatores que beneficiam a estabilidade em longo prazo do implante, porém clinicamente não foi comprovada vantagem sobre a liga de cromo-cobalto. Os designs dos componentes femorais disponíveis são: afunilado, cilíndrico e anatômico. Atualmente a mais utilizada é a geometria afunilada, que aproveita a microelasticidade do osso, permitindo

um melhor ajuste do implante ao melhorar a distribuição da carga proximal do dispositivo. Os implantes cimentados e não cimentados da Biomedtrix[®] possuem as mesmas proporções de dimensão de cabeça e área côncava do acetábulo, o que permite a formação de sistemas híbridos (1).

O terço proximal da haste femoral é recoberto com revestimento poroso que permite o crescimento ósseo. O componente acetabular consiste em uma cúpula de metal revestido com a mesma superfície porosa na área convexa e uma camada de polietileno de alto peso molecular específico para próteses articulares na região côncava, que fará contato com a nova cabeça femoral. A porção dorsal é chanfrada para melhorar o movimento de abdução da articulação coxofemoral (6).

A angulação entre o pescoço e a haste protética influencia toda a função muscular da articulação coxofemoral. A capacidade de geração de movimento dos músculos abdutores é reforçada com angulação de 120° entre o pescoço e a haste protética, por outro lado os demais grupos musculares recebem tal benefício quando este ângulo é de 140°. Portanto, um ângulo pescoço-haste de 130° promove uma harmonia sensata (18).

Planejamento cirúrgico

Baseado no grau de magnificação da imagem radiográfica, utiliza-se o molde de acetato ou digital adequado para determinação prévia das dimensões dos componentes protéticos. Em radiografia de projeção ventro-dorsal, posiciona-se a extremidade lateral proximal do modelo sobre o istmo femoral, entre a cabeça femoral e o trocanter maior. A linha média do modelo deve sobrepor o eixo longitudinal diafisário do fêmur. O maior componente que preencher os contornos das margens endosteais da metáfise e da diáfise deve ser o selecionado. Testa-se o mesmo em projeção latero-lateral para confirmar o preenchimento craniocaudal do canal femoral. Uma estimativa do tamanho da cúpula é feita por meio da mensuração da largura de abertura craniocaudal do acetábulo e avaliação da espessura óssea medial, pela projeção ventro-dorsal. Os tamanhos serão definitivamente decididos apenas durante o procedimento, portanto, é aconselhável ter opções variadas de tamanho disponíveis (19).

Técnica cirúrgica

O posicionamento perfeito é fundamental para o adequado posicionamento dos componentes protéticos. O animal deve ser posicionado em decúbito lateral com precisa sobreposição das asas do ílio e ísquio. Após tricotomia ampla e devida antisepsia do campo cirúrgico, faz-se o acesso crânio lateral modificado para exposição da articulação coxofemoral (20).

Com auxílio de uma serra oscilatória, retira-se a cabeça e colo femorais com angulação baseada na do colo protético. Dupla fresagem do acetábulo (sendo a primeira fresa subdimensionada e a segunda com o tamanho adequado da cúpula selecionada) é realizada, criando-se um leito livre de tecido cartilaginoso e fibroso. Utilizando a superfície chanfrada como referência, posiciona-se a cúpula com ângulo de abertura lateral medindo entre 35° e 45° e retroversão entre 15° e 20°. O encaixe do componente acetabular é feito por pressão, utilizando-se um posicionador específico. O próximo passo é o preparo do canal femoral, na qual se faz a perfuração e fresagem em ângulo neutro de anteversão. Como no sistema cimentado, o leito deve ser exatamente do tamanho do componente, utilizam-se as brocas em sequência crescente de tamanho, testando a inserção do componente femoral entre cada uma delas. Insere-se a haste femoral, também por encaixe. Utilizando os modelos de cabeça femoral, testa-se o comprimento do pescoço adequado para o animal em questão. Tal teste é feito por meio da redução articular e movimentação do membro, na qual deve haver adequada amplitude de movimento sem frouxidão articular e/ou luxação da prótese. Selecionado o

tamanho do colo, coloca-se a cabeça femoral definitiva e reduz-se a nova articulação. Cápsula articular, camada muscular, subcutânea e pele são suturadas com padrão de rotina (19).

Avaliação Radiográfica

Posicionamento da Cúpula acetabular

Ângulo de abertura lateral– Analisando-se a radiografia ventro-dorsal, verifica-se a conformação da superfície chanfrada da cúpula. Quando esta aparece como uma linha reta, significa que o ângulo está corretamente medindo 45°; quando em forma côncava a angulação está muito aberta ($> 45^\circ$); já em cúpulas fechadas ($< 45^\circ$) a linha vai estar em forma convexa (Fig. 2). Aferição mais precisa pode ser feita pelo ângulo formado entre uma linha paralela ao plano médio do animal e uma linha unindo as quinas da superfície chanfrada da cúpula (21).

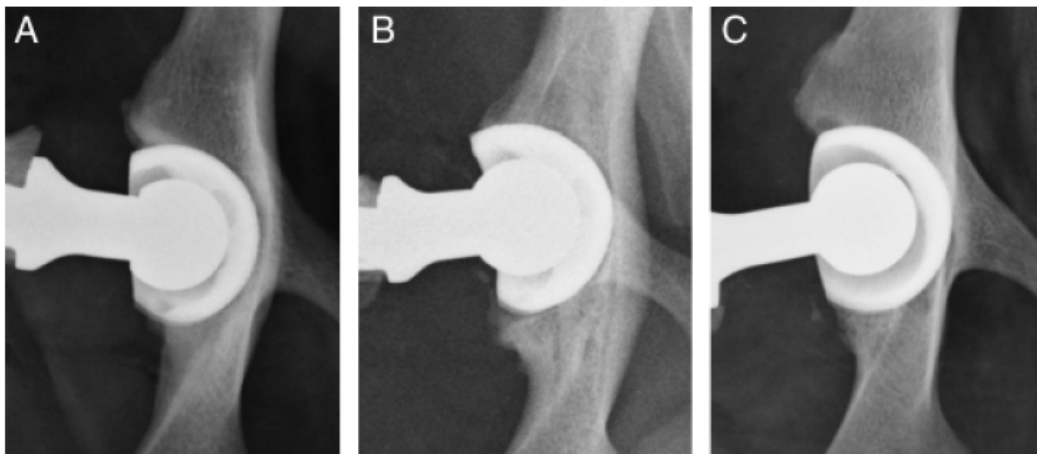


Figura 2. Imagens radiográficas pós-operatórias mostrando as diferentes orientações possíveis da cúpula acetabular. (A) Com ângulo de abertura lateral (ALO) de 45° - a superfície chanfrada da cúpula aparece como uma linha reta; (B) com a cúpula aberta (ALO $>45^\circ$) a superfície chanfrada afigura-se côncava; (C) com uma cúpula fechada (ALO $<45^\circ$) - a superfície chanfrada aparece convexa. (21).

Ângulo de versão- Consiste no ângulo que determina a inclinação crânio-caudal do acetábulo. É definido entre uma linha traçada ao longo do eixo ilio-isquiático e uma linha pelo bisel da cúpula em projeção latero-lateral (22).

Ângulo de Norberg da cabeça protética – Em projeção ventro-dorsal, traça-se uma linha conectando os centros da cabeça e haste femoral e outra ligando o centro da cabeça femoral com a borda crânio-dorsal do acetábulo. O ângulo entre elas consiste no Norberg da cabeça prostática, o qual avalia o grau de cobertura acetabular da nova cabeça femoral (23).

Posicionamento da Haste femoral

Alinhamento mediolateral em relação ao canal femoral - É determinado pela diferença entre o ângulo pescoço-haste e o ângulo pescoço-diáfise. Resultado entre 0° e 1° significa ótimo posicionamento neutralizado, maior que 1° indica haste em posição *varus* (desvio lateral) e angulação negativa indica posição *valgus* da haste (desvio medial) (Fig.3). As mensurações devem ser feitas em projeção ventro-dorsal (23).



Figura 3. Imagens radiográficas em projeção ventro-dorsal pós-operatórias mostrando o alinhamento da haste femoral. (A) haste em posição varus; (B) haste em valgus e (C) haste neutralizada (23).

Alinhamento craniocaudal em relação ao canal femoral – Utilizando-se projeção latero-lateral, traçam-se os eixos longitudinais da haste e da diáfise femorais. A angulação entre eles define o alinhamento, sendo o correto a sobreposição das linhas. Estipulando o eixo diafisário como 90°, ângulos agudos definem retroversão da haste e oblíquos anteversão da mesma (24).

Estabilidade do implante

Nível da prótese – A ocorrência de afundamento da prótese é avaliada comparando-se o nível do rebordo próximo lateral da haste e o istmo do fêmur entre o trocanter maior e o colo femoral, que devem estar sobrepostos (25).

Preenchimento do canal femoral – É calculado pela razão entre a largura do implante e a largura do canal femoral. Três mensurações devem ser feitas em projeção ventro-dorsal, sendo uma na região de transição da área porosa com a lisa, uma na extremidade distal da haste e a terceira no ponto médio entre estas. Recomenda-se preenchimento maior que 80%, preferencialmente 90% (25).

Reações ósseas - Áreas de radioluscência nas interfaces dos implantes com o tecido ósseo ou sinais de osteólise podem demonstrar soltura séptica ou asséptica do implante. Regiões escleróticas também podem ser sinais de infecção (26). Remodelamento ósseo é esperado em resposta ao implante, porém resposta exacerbada pode indicar instabilidade da prótese. É importante o acompanhamento radiográfico para avaliar a progressão de tais mudanças (27).

Complicações

Mesmo com a alta porcentagem de sucesso do procedimento, a artroplastia está sujeita a diversas complicações (3).

Infecção

Infecção é a mais séria e comprometedora complicação das artroplastias coxofemorais em cães. Pode resultar em soltura séptica do implante, diminuição da função articular e potencial necessidade de remoção dos componentes para resolução do problema (27).

As infecções podem ter curso agudo, no qual ocorre como infecção na ferida cirúrgica; ou tardio/crônico, em que comumente desenvolve-se com curso clínico insidioso. Quanto à etiologia da infecção, acredita-se que as agudas estão fortemente relacionadas à contaminação intraoperatória, tanto por fonte aérea ou por procedimento não estéril; enquanto as crônicas podem ser secundárias à infecção intraoperatória ou a fontes hematógenas (14).

Implantes infectados requerem agressiva antibioticoterapia baseada em cultura e antibiograma antes da cautelosa reimplantação de qualquer biomaterial (28).

Soltura asséptica

O conceito de soltura asséptica abrange a complexa interação entre fatores biomecânicos, mecânicos e biológicos específicos do indivíduo afetado. A presença de pseudomembranas ao redor de próteses soltas assepticamente é bem documentada, assim como a associação destas membranas com áreas de lesões osteolíticas. O detalhamento destes tecidos mostra a presença de micropartículas e debris celulares, os quais estimulam a atração de numerosos macrófagos encontrados histologicamente e a reação ao corpo estranho dos mesmos. Esta reação resulta em significativa produção de colagenase, prostaglandina E₂ e interleucina-1 ativa, todos conhecidos promotores da reabsorção óssea. Este estímulo pode ser dado também por micromovimentos de um implante instável. A dinâmica da interface prótese-osso envolve constante crescimento ósseo interno assim como reabsorção associada com o reparo do tecido fibroso. Em um implante estável, estas forças devem estar próximas ao equilíbrio, entretanto, no implante instável, como já explicado, a reabsorção ocorre em maior grau com reparo fibroso subsequente, que ocupará a interface e impedirá a osteointegração à prótese. Lavagem adequada dos leitos, tanto acetabular quanto femoral, pós fresagem e correto posicionamento dos implantes são os meios de prevenir tais estímulos inflamatórios. A soltura asséptica costuma progredir assintomaticamente até a falha total do implante, quando serão percebidas claudicação e alterações no uso do membro (29).

A diferenciação radiográfica entre soltura asséptica e séptica é um desafio, pois os sinais radiográficos são semelhantes: áreas de radioluscência periprotéticas, osteólise e movimentação da prótese. A análise radiográfica sequencial pode contribuir para a diferenciação, já que nos casos de infecção os sinais evoluirão mais rapidamente. Para se ter parâmetros do indivíduo, é necessário um controle radiográfico frequente. Comprovada a inexistência de infecção, as revisões de próteses soltas assepticamente são menos complexas e bem sucedidas (30).

Luxação

O ângulo de abertura lateral da cúpula acetabular está intimamente relacionado com a ocorrência de luxação dorsal da prótese coxofemoral. Tal correlação é explicada pelo fato de que o aumento deste ângulo resulta em diminuição da cobertura dorsal da cabeça femoral. Entretanto, há registros de artroplastias cujo ângulo de abertura lateral da cúpula foi maior do

que 60° sem ocorrência de luxação, o que sugere que existem outros fatores determinantes da redução articular, como a adequada tensão dos tecidos moles. Inadequação de tal tensão pode ser causada por comprimento errôneo do pescoço femoral, prótese pequena para o cão ou variação individual. Há evidências de que apropriada recuperação dos tecidos moles (formação de fibrose periarticular e recuperação da atrofia muscular) pode compensar o mau posicionamento acetabular, o que pode ser comprovado pelo fato de que a grande maioria das luxações ocorre no período de reabilitação do cão. Pacientes idosos com maior frouxidão das estruturas capsulares e menos força muscular estão mais sujeitos a tal complicação. Cães com identificação do ângulo de abertura lateral do acetábulo maior que 60° na radiografia pós-operatória imediata devem ter o período de repouso prolongado (31).

Já os riscos da luxação ventral incluem pescoço femoral curto e, impactos do mesmo com a cúpula, os quais podem ser predispostos por um baixo ângulo de abertura lateral acetabular e/ou cúpula subdimensionada para o animal. Influência da tensão inadequada dos tecidos moles também é citada (22).

A luxação dorsal é mais prevalente que a ventral (4.7% x 1.8%); a primeira está sob total controle do cirurgião, que deve inserir a cúpula com angulação lateral entre 35° e 45° e realizar adequada reconstrução dos tecidos moles (31). Como na luxação ventral não há um fator principal predisponente identificado, este controle trans-cirúrgico é dificultado. Ainda assim, a revisão da artroplastia com reposicionamento acetabular é majoritariamente bem sucedida em ambas as situações (22).

Fratura do fêmur

Fatores predisponentes para a ocorrência de fratura do fêmur que recebeu prótese incluem osteopatias, cirurgias prévias em coxal e fissuras causadas durante o procedimento de artroplastia. Trauma, carga excessiva e torção no período pós-cirúrgico também influenciam a ocorrência de tal complicação, o que corrobora a necessidade de repouso do animal. Proprietários de cães idosos com baixa qualidade óssea causada por grave doença degenerativa crônica ou demais osteopatias e de cães jovens muito ativos devem ser enfatizadamente orientados dos riscos cirúrgicos e cuidados pós-operatórios de uma artroplastia coxofemoral (32).

As fraturas podem ocorrer tanto no trans quanto no pós-operatório, tardio ou imediato, sendo no último mais comum. As fraturas desenvolvem-se normalmente próximas à extremidade distal da haste femoral e geralmente causam deslocamento da prótese, sendo o afundamento mais comum (16).

As fissuras intraoperatórias ocorrem principalmente durante a fresagem do canal femoral ou colocação da haste. As fissuras podem se propagar e causar fraturas e, portanto devem ter suas forças neutralizadas através do uso de múltiplas cerclagens completas, com intervalos de 1 cm entre cada uma, abrangendo toda a fissura e ultrapassando pelo menos 1 cm da mesma. Quanto às fraturas femorais pós artroplastia total de quadril recomenda-se estabilização com o uso de placas e parafusos, associando-se fios de cerclagem quando necessário. O prognóstico é bom quando as fraturas são corretamente tratadas (32).

Neuropraxia do nervo isquiático

Neuropraxia consiste em falha da condução nervosa decorrente de desmembramento da mielina, que causa mudanças estruturais e perda parcial da continuidade axonal. Os sinais clínicos incluem déficit da propriocepção consciente, déficit ou inabilidade de extensão dos dígitos e diminuição da flexão da articulação tíbio-társica. As potenciais causas de neuropraxia do ciático após uma artroplastia coxofemoral são: compressão mecânica do nervo direta ou indiretamente, incisão do nervo, lesão térmica pela cimentação, aprisionamento no

tecido periarticular (principalmente quando o grau de osteoartrose é elevado) e tensão exacerbada durante a redução da nova articulação. A idade do animal (provavelmente pelo maior grau de osteoartrose) e tempo cirúrgico elevado (pressupõe-se que relacionado à maior dificuldade cirúrgica) estão significativamente associados a aumento da probabilidade de neuropraxia isquiática. Peso corpóreo, grau de luxação pré-cirúrgico e artroplastias de revisão são variáveis dificultadoras que influenciam diretamente. Um estudo que avaliou 1000 artroplastias coxofemorais consecutivas, realizadas por um mesmo cirurgião, revelou frequência de 1,9% de neuropraxia do ciático. Apesar do tempo de recuperação ser imprevisível e às vezes prolongado (entre 10 e 120 dias neste trabalho), a melhora total do quadro de neuropraxia do nervo isquiático em cães é comum (33).

Infarto do canal femoral

Um estudo retrospectivo realizado no Hospital Veterinário da Universidade da Carolina do Norte provou a ocorrência de infarto do canal femoral em cães após artroplastia coxofemoral. Foram diagnosticados 14% dos animais submetidos à artroplastia coxofemoral em um período de 14 anos. A incidência em sistemas cimentados e não cimentados foi a mesma. Nenhum dos animais apresentou sinais clínicos, apenas radiológicos, entretanto tal estudo mostra a importância da afecção como diagnóstico diferencial. A artéria nutrícia é a principal fonte de suprimento sanguíneo para o canal femoral. A perfuração e fresagem do canal medular, além da inserção da haste femoral e técnica de cimentação podem lesar tal artéria, causando isquemia e infarto medular subsequentes. Ossos longos imaturos possuem fluxo intramedular predominante e fluxo periosteal como suprimento secundário, isso se inverte quando os ossos maturam o que explica a maior predisposição de cães mais novos a sofrerem infarto intramedular. As alterações radiográficas iniciais são sutis e inespecíficas, podendo ser confundidas com infecção ou neoplasia; porém, com o passar do tempo, ocorre calcificação das margens do tecido ósseo infartado que forma uma imagem patognomônica de infarto medular, chamada de “fumaça na chaminé” ou “fumaça de cigarro”. Uma alternativa de diagnóstico precoce é a realização de ressonância magnética. Não há relato de correlação entre infarto do canal femoral e fratura do fêmur ou falha do implante, porém há um relato de desenvolvimento de osteossarcoma na área do infarto medular causado por prótese total, 5 anos após a cirurgia. É provado, tanto em humano quanto em cães, que a presença de infarto pode predispor ocorrência de sarcomas, portanto aconselha-se regular reavaliação clínica e radiográfica em cães que apresentaram infarto medular após a artroplastia coxofemoral (33).

Embolismo pulmonar

Embolismo pulmonar é definido como oclusão de uma artéria pulmonar por um embolo que se originou em um sítio distante da circulação venosa. O aumento da pressão intramedular do fêmur é o principal fator patogênico de embolismo pulmonar durante artroplastias coxofemorais. A ocorrência desta afecção é predominante em sistemas cimentados, devido à participação do polimetilmetacrilato como partícula sujeita a embolia, porém no sistema não cimentado a prevalência de ar, gordura (principal causa), medula óssea e coágulos não é menor. Lavagem meticulosa do canal femoral após fresagem do mesmo é a principal medida profilática (34).

O embolismo pulmonar após as artroplastias coxofemorais em cães é subdiagnosticado, pois a afecção é, na maioria das vezes, assintomática e com recuperação espontânea. Entretanto, cães com função cardiopulmonar limitada e doenças metabólicas que predispoem o embolismo pulmonar, como hiperadrenocorticismo, devem receber maior atenção dos parâmetros respiratórios durante e após as artroplastias. Fluidoterapia intra e pós-operatória

mantendo a normovolemia do animal auxilia a diminuir os efeitos, em curto prazo, do embolismo (35).

Pós – operatório

Atividade excessiva nas primeiras 8 a 12 semanas de pós-operatório deve ser evitada, pois aumenta os riscos de complicações como luxação, fratura do fêmur e comprometimento da estabilidade dos implantes. Recomendam-se, portanto 4 a 8 semanas de restrição de atividade seguidas por 4 semanas de caminhadas guiadas por coleira, progressivas, até o retorno da atividade normal do cão. Nesse período de atividade limitada, exercícios controlados evitam a perda de densidade óssea peri-implante e aceleram a remodelação óssea, a recuperação da força muscular e do controle e coordenação neuromuscular, o que proporciona maior proteção à articulação, principalmente em cães com atrofia muscular pré-operatória. Estes processos podem ser prolongados em cães idosos. Mesmo tendo o objetivo de proporcionar estabilidade imediata com o intuito de permitir rápido apoio de peso no membro, carga excessiva no membro submetido à artroplastia provoca inibição do crescimento ósseo em direção ao implante, pois se cria uma camada de membrana fibrovascular entre o osso e a prótese, comprometendo a fixação biológica do sistema. Atividades na água mostram-se muito eficazes na reabilitação de pacientes submetidos à artroplastia total de quadril (36).

COMENTÁRIOS FINAIS

Limitações e complicações estão presentes em qualquer técnica cirúrgica, as relacionadas à artroplastia coxofemoral não competem com a indicação, viabilidade e alta taxa sucesso do procedimento. O sistema não cimentado não foi desenvolvido com o intuito de substituir o cimentado, mas sim para somar vantagens e reduzir as complicações da técnica. Porém, existem situações em que o sistema não cimentado é contraindicado/não aconselhado. Outro fator a ser considerado é a disponibilidade financeira do proprietário do cão, que ainda é um importante limitante da realização de artroplastia coxofemoral na Medicina Veterinária, especialmente no Brasil. A curva de aprendizado para a técnica descrita é mais simples para aqueles cirurgiões já familiarizados com o sistema cimentado. Um cirurgião veterinário apto a utilizar os dois sistemas mostra-se mais versátil e preparado para a rotina de artroplastias coxofemorais. O sucesso da artroplastia coxofemoral é fonte de estímulo para o desenvolvimento de próteses para demais articulações, ratificado pelos avanços dos implantes e técnicas para artroplastia de cotovelo e joelho em cães. A perspectiva é de que o tratamento das osteoartroses graves em animais tenha futuro cada vez mais promissor.

REFERÊNCIAS

1. Peck JN, Marcellin-Little DJ. *Advances in small animal total joint replacement*. New York: John Wiley & Sons; 2012.
2. Minto BW, Steagall PVM, Mamprim MJ, Brandão CVS, Pereira JGC, Ranzani JJT. Artroplastia total coxofemoral em cães. Estudo experimental com prótese nacional. *Cienc Rural*. 2008;38:136-42.
3. Minto BW, Brandão CVS, Pereira JGC, Ranzani JJT. Prótese total da articulação coxofemoral em cães. *Vet Zootec*. 2006;13:7-17.

4. Minto BW, Brandão CVS, Pereira JGC, Ranzani JJT. Utilização do sistema modular na prótese total da articulação coxofemoral em cães. *Acta Sci Vet.* 2006;34:163-6.
5. Santos Junior WS, Dos Reis PSB, Abreu AC, Fernandes A, Silva RS, Cardoso Junior RB, et al. Artroplastia total de quadril cimentada com sistema modular: relato em 16 cães. *Nosso Clin.* 2011;14:12-21.
6. Roe S. New hip for ailing dog. *Clin Sci.* 2001;16:14-6.
7. Pozzi A, Kowaleski MP, Dyce J, Johnson KA. Treatment of traumatic coxo-femoral luxation by cemented total hip arthroplasty. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2004;14:198-203.
8. Jankovits DA, Liska WD, Kalis RH. Treatment of avascular necrosis of the femoral head in small dogs with micro total hip replacement. *Vet Surg.* 2012;41:143-7.
9. Kalis RH, Liska WD, Jankovits DA. Total hip replacement as a treatment option for capital physeal fractures in dogs and cats. *Vet Surg.* 2012;41:148-55.
10. Fitzpatrick N, Pratola L, Nikolau C, Hamilton M, Farrel M. Total hip replacement after failed femoral head and neck excision in two dogs and two cats. *Vet Surg.* 2012;41:136-42.
11. Scherrer W, Holsworth I, Goossens M, Schulz KS. Coxofemoral arthroscopy and total hip arthroplasty for management of intermediate grade fibrosarcoma in a dog. *Vet Surg.* 2005;34:43-6.
12. Preston CA, Schulz KS, Vasseur PB. Total hip arthroplasty in nine canine hind limb amputees: a retrospective Study. *Vet Surg.* 1999;28:341-7.
13. Liska WD. The learning curve: avoiding technical errors and complications. In: *Science Week Proceedings; 2013, Australia. Australia: The Australian and New Zealand College of Veterinary Scientists; 2013. p.16-8.*
14. Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB. Infection after total hip arthroplasty. *J Bone Jt Surg.* 1996;78:512-23.
15. Liska WD. Cemented and cementless hip replacement: current perspective. In: *Science Week Proceedings; 2013, Australia. Australia: The Australian and New Zealand College of Veterinary Scientists; 2013. p.21-5.*
16. Ganz SM, Jackson J, Vanenkevort B. Risk factors for femoral fracture after canine press-fit cementless total hip arthroplasty. *Vet Surg.* 2010;39:688-95.
17. Margalit KA, Hayashi K, Jackson J, Kim Young Sun, Garcia TC, Wiggans KT, et al. Biomechanical evaluation of acetabular cup implantation in cementless total hip arthroplasty. *Vet Surg.* 2010;39:818-23.
18. Delp SL, Komattu AV, Wixson RL. Superior displacement of the hip in total joint replacement: effects of prosthetic neck length, neck-stem angle, and anteversion angle on the moment-generating capacity of the muscles. *J Orthop Res.* 1994;12:860-70.

19. DeYoung DJ, DeYoung BA, Aberman HA, Kenna RV, Hungerford DS. Implantation of an uncemented total hip prosthesis. technique and initial results of 100 arthroplasties. *Vet Surg.* 1992;21:168-77.
20. Olmstead ML, Hohn RB, Turner TM. Technique for canine total hip replacement. *Vet Surg.* 1991;10:44-50.
21. Gemmill TJ, Pink J, Renwick A, Downes C, Roch S, Mckee M. Hybrid cemented/cementless total hip replacement in dogs:seventy-eight consecutive joint replacements. *Vet Surg.* 2011;40:621-30.
22. Nelson LL, Dyce J, Shott S. Risk factors for ventral luxation in canine total hip replacement. *Vet Surg.* 2007;36:644-53.
23. Mostafa AA, Druen S, Nolte I. Radiographic evaluation of early periprosthetic femoral bone contrast and prosthetic stem alignment after uncemented and cemented total hip replacement in dogs. *Vet Surg.* 2012; 41:69-77.
24. Jehn CT, Manley PA. The effects of femur and implant position on the radiographic assessment of total hip femoral implants in dogs. *Vet Surg.* 2002;31:349-57.
25. Marcellin-Little DJ, Deyoung AB, Doyens DH, Deyoung DJ. Canine uncemented porous-coated anatomic total hip arthroplasty: results of a long-term prospective evaluation of 50 consecutive cases. *Vet Surg.* 1999;28:10-20.
26. Ireifej S, Marino DJ, Loughin CA, Lesser ML, Akerman M. Risk factors and clinical relevance of positive intraoperative bacterial cultures in dogs with total hip replacement. *Vet Surg.* 2012;41:63-8.
27. Harvey EJ, Bobyn JD, Tanzer M, Stackpool J, Krygier JJ, Hacking SA. Effect of flexibility of the femoral stem on bone-remodeling and fixation of the stem in a canine total hip arthroplasty model without cement. *J Bone Jt Surg Ser A.* 1999;81-A:93-105.
28. Haddad FS, Muirhead-Allwood SK, Manktelow ARJ, Bacarese-Hamilton I. Two-stage uncemented revision hip arthroplasty for infection. *J Bone Jt Surg Ser B.* 2000;82-B:689-94.
29. Dowd JE. Aseptic loosening in uncemented total hip arthroplasty in a canine model. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;(319):106-21.
30. Parvizi J, Jafari SM, Purtill JJ. Aseptic loosening of total hip arthroplasty: infection always should be ruled out. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;(469):1401-5.
31. Dyce J, Wisner ER, Wang Q, Olmstead ML. Evaluation of risk factors for luxation after total hip replacement in dogs. *Vet Surg.* 2000;29:524-32.
32. Liska WD. Femur fractures associated with canine total hip replacement. *Vet Surg.* 2004;33:164-72.

33. Andrews CM, Liska WD, Roberts DJ. Sciatic neurapraxia as a complication in 1000 consecutive canine total hip replacements. *Vet Surg.* 2008;37:254-62.
34. Tidwell SA, Graham JP, Peck JN, Berry CR. Incidence of pulmonary embolism after non-cemented total hip arthroplasty in eleven dogs: computed tomographic pulmonary angiography and pulmonary perfusion scintigraphy. *Vet Surg.* 2007;36:37-42.
35. Liska WD, Poteet B. Pulmonary embolism associated with canine total hip replacement. *Vet Surg.* 2003;32:178-86.
36. Liska WD, Doyle ND. Total joint arthroplasty: surgery and rehabilitation. In: *Science Week Proceedings; 2013, Australia.* Australia: The Australian and New Zealand College of Veterinary Scientists; 2013. p.82-8.

Recebido em: 23/09/2013

Aceito em: 14/01/2014

CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO PÓS-PARTO EM BOVINOS

Carolina Nogueira de Moraes¹

Leandro Maia¹

Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga¹

Eunice Oba¹

RESUMO

O puerpério é conhecido como o período que se inicia após o parto e persiste até o restabelecimento da condição de um animal não gestante. Compreendem na liberação dos restos placentários, involução uterina e mecanismos tais como contração uterina e digestão enzimática contribuem para a correta execução desses processos. Sua duração é variável e dependente de vários fatores tais como escore de condição corporal (ECC), produção leiteira, nutrição, condição uterina, entre outros. Tem-se também que para o estabelecimento de nova prenhez, é necessário que ocorra o retorno à ciclicidade por meio do crescimento, maturação e ovulação de um folículo e oócito saudáveis. Tal fato pode ser afetado pela presença do bezerro, amamentação e ECC em bovinos de corte e balanço energético, escore corporal, parição, estação do ano e doenças em bovinos de leite. Adicionalmente, é de extrema importância a característica do útero para o restabelecimento do estado reprodutivo fisiológico. Doenças uterinas podem afetar na liberação de substâncias que podem ser responsáveis pelo encurtamento ou prolongamento dos ciclos ovarianos, o que pode ocasionar perdas econômicas pelo fato de não atingir-se o desejável de produção de um bezerro/vaca/ano.

Palavras-chave: doenças uterinas, bovinos, ciclicidade, puerpério

CONSIDERATIONS ABOUT THE POSTPARTUM IN CATTLE

ABSTRACT

The postpartum period is known as the period that begins after birth and persists until the recovery of the condition of an animal that is not pregnant. They include the release of placental membranes, the uterine involution and mechanisms such as uterine contraction and enzymatic digestion contribute to the proper execution of these processes. Its duration is variable and dependent on several factors such as body condition score (BCS), milk production, nutrition, uterine condition, among others. It has also for the establishment of new pregnancy, it is necessary the return to cyclicity through growth, maturation and ovulation of a healthy follicle and oocyte. This can be affected by the presence of the calf, breast - feeding and BCS in beef cattle and energy balance, body condition score, parity, season and disease in dairy cattle. Additionally, it is extremely important the characteristic of the uterus for restoration, reproductive physiology. Uterine diseases can affect the release of substances that may be responsible for shortening or lengthening of ovarian cycles, which can cause economic losses because of not achieving is desirable to produce a calf / cow / year.

Keywords: uterine diseases, cattle, cyclicity, puerperium

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp Botucatu, Contato principal para correspondência.

CONSIDERACIONES SOBRE EL PERÍODO DESPUÉS DEL PARTO EN EL GANADO

RESUMEN

El puerperio es conocido como el periodo que se inicia después del parto y persiste hasta el restablecimiento de la condición de un animal no gestante. Comprende desde la liberación de los restos placentarios, involución uterina y mecanismos tales como contracción uterina y digestión enzimática, que contribuyen para la correcta ejecución de estos procesos. Su duración es variable y depende de varios factores, como condición corporal (CC), producción lechera, nutrición, estado del útero, entre otros. Para el restablecimiento de una nueva preñez, es necesario que ocurra el retorno del ciclo estral por medio del crecimiento, maduración y ovulación de un folículo y oocito sanos. Esto puede ser afectado por la presencia del ternero, amamantamiento y condición corporal en bovinos de corte y balance energético, condición corporal, parto, estación del año y enfermedades en bovinos de leche. Adicionalmente, es de extrema importancia la característica del útero para el restablecimiento del estado reproductivo fisiológico. Enfermedades uterinas pueden afectar la liberación de sustancias que pueden ser responsables del acortamiento o prolongación de los ciclos ovarianos, lo que puede ocasionar pérdidas económicas por el hecho de no alcanzar lo deseado de producción de 1 ternero/vaca/año.

Palabras clave: enfermedad uterina, ganado, ciclicidad, puerperio

INTRODUÇÃO

O puerpério é o período que ocorre após o parto e persiste até o restabelecimento da condição normal de uma fêmea não prenhe. Caracteriza-se pela ocorrência de alterações fisiológicas no útero para prepará-lo para o recebimento de uma nova gestação (1, 2).

Esse período abrange uma fase de inatividade ovariana e sexual previamente ao retorno à ciclicidade. É variável e pode ser afetado por fatores tais como: 1- produção leiteira, 2 - amamentação, 3 - nutrição, 4 - escore de condição corporal (ECC) e 5 - condições uterinas (3).

O retorno à ciclicidade pode ser tardio em decorrência do balanço energético negativo (BEN), retenção de placenta, infecções uterinas e distocia (4). Esse fato afeta a taxa de concepção e consequentemente o intervalo entre partos (5).

O parto é considerado um período de alto risco devido às chances de danos físicos, falha na liberação da placenta e contaminação bacteriana, sendo que a última gera maior impacto na saúde e produtividade animal (6).

O monitoramento do estado de saúde da vaca, perda de condição corporal, além do tratamento de distúrbios tanto infecciosos quanto metabólicos no início da lactação podem auxiliar no controle dos distúrbios de fertilidade no período do pós-parto (7). Além do mais, o manejo nutricional é importante para reduzir a incidência de retenção de placenta, o que por sua vez é um fator de risco para a endometrite (8).

É de extrema valia o correto manejo alimentar no pré-parto para manutenção de boa condição corpórea ao parto (9), idealizando-se que seja mantido escores entre 2,75 a 3,00 no parto (escala de 1 a 5) (8) com perda de menos de 0,5 unidade de escore corporal no pós-parto (4). Isso irá prevenir o BEN prolongado e a ocorrência de enfermidades metabólicas (5).

Na opinião de Roche (8), a alta eficiência reprodutiva é dependente da involução uterina (dentro de 50 dias pós-parto), volta à ciclicidade, eficiência na detecção do estro e altas taxas de concepção/serviço. A reduzida eficiência reprodutiva pode diminuir a rentabilidade,

aumentar os dias em aberto, intervalo entre partos, número de serviços/concepção, gastos com a reposição de animais e mão de obra especializada (10).

Para maiores ganhos econômicos, objetiva-se que a concepção ocorra antes dos 60 dias pós-parto (11) ou ainda dentro dos primeiros 85 dias pós-parto para idealizar-se o intervalo entre partos de 12 meses (4). Causas fisiológicas, de manejo e o próprio sistema de exploração podem interferir nesse objetivo (11). Nesse sentido, o objetivo dessa revisão é fazer considerações acerca do puerpério em bovinos, relatando os aspectos fisiológicos e os principais problemas encontrados durante este período, que justifiquem o atraso ao retorno da atividade reprodutiva.

REVISÃO DE LITERATURA

Fisiologia do puerpério

Após o parto, para o estabelecimento de uma nova gestação, é necessário que ocorra a limpeza e involução uterina, acompanhadas do retorno à ciclicidade. Tais mecanismos devem culminar no crescimento de um folículo saudável com o desenvolvimento de um oócito competente, demonstração de cio, ovulação, fertilização e adesão uterina por um embrião viável (7).

De acordo com Senger (12), cinco principais eventos estão envolvidos no puerpério, sendo eles: 1) contração miometrial; 2) expulsão do lóquio; 3) reparo endometrial; 4) retorno das funções ovarianas e por fim 5) eliminação da contaminação bacteriana do trato reprodutivo.

Conforme revisado por Emerick et al. (13), o puerpério pode ser dividido em três períodos: (1) *período puerperal propriamente dito*, que inicia-se após liberação fetal e continua até que a hipófise adquira a capacidade de resposta ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH); (2) *período intermediário* que começa com o aumento da sensibilidade da hipófise perante os estímulos do GnRH, perdurando até a primeira ovulação. É nesta fase que a idade, estado nutricional, parto eutócico ou distócico, retenção de placenta e infecções puerperais podem interferir e aumentar o intervalo parição-primeira ovulação, e (3) *período pós-ovulatório* o qual se inicia após a primeira ovulação até completa involução uterina.

Obstetricamente, o período puerperal pode ser dividido em duas etapas que incluem eliminação das secundinas fetais ou delivramento e puerpério propriamente dito ou involução uterina (2).

Delivramento

Este período vai do final do parto até a eliminação das membranas fetais. Ocorre devido ao processo de contração do miométrio e perda da aderência placentária. As contrações uterinas, responsáveis por facilitar a descarga de fluidos e debrís do útero por minimizar o risco de hemorragia, reduzem-se gradativamente após o parto, provocando diminuição no tamanho das fibras musculares, reduzindo assim o tamanho uterino (2).

O cortisol, responsável pelo início do processo de parição, induz a migração das células binucleadas da porção fetal para a porção maternal da placenta. Tais células, que produzem lactógenos placentários e proteína da gestação, ao realizarem a migração degranulam e expressam os antígenos da classe MHC-1 ao entrarem em contato com o endométrio. Desta forma, o sistema imune maternal acaba atacando e rejeitando o tecido placentário (14).

A separação placentária ocorre devido à resposta do sistema imune maternal e pela produção de fatores ativadores dos neutrófilos dentro do epitélio caruncular. Quando há uma completa maturação da unidade materno-fetal, caracterizada pela redução de células

binucleadas, aumento de estrógeno e progesterona, há estímulo para a queda de colágeno dentro do viló coriônico, auxiliando na separação da carúncula e do cotilédone (15).

A inadequada nutrição durante o período seco e no pós-parto resulta em níveis reduzidos de glicose, insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), baixa frequência nos pulsos de hormônio luteinizante (LH), com aumento de β hidroxí butirato, ácidos graxos não esterificados e triglicérides. A mobilização de lipídeos e de reservas protéicas pode ocasionar desordens metabólicas tais como hipocalcemia, acidose, cetose, esteatose hepática e deslocamento de abomaso. Essas condições podem afetar a contratilidade uterina, podendo contribuir para ocorrência da retenção de placenta e endometrite (8).

Para evitar a retenção placentária, observada em 2 a 5% dos animais de um rebanho, as secundinas fetais devem ser eliminadas em até 12 horas, tendo em vista o rápido fechamento da cérvix (2, 6, 8).

Involução uterina

A involução uterina envolve contração física, necrose e liberação das carúnculas, regeneração do endométrio e eliminação bacteriana (1, 6).

A involução uterina se dá em escala logarítmica com a principal mudança ocorrendo durante os primeiros dias do pós-parto (16). Tem a duração de cerca de 30 a 60 dias em taurinos e 100 a 120 dias em zebuínos. Após o parto, os lisossomos antes estáveis pela presença da progesterona liberam enzimas proteolíticas que digerem as células que se proliferaram (2).

Seguida a separação do cotilédone fetal da carúncula materna ocorre vasoconstrição e início da necrose do tecido caruncular o qual após cinco dias do parto começa a perder a organização e a integridade celular. Posteriormente ao destacamento da carúncula, inicia-se o processo de reparação do local em que se encontrava e eventualmente cobertura do lúmen uterino com o epitélio endometrial (12).

Acrescido ao tecido caruncular necrosado, restos dos fluidos fetais e sangue da ruptura do cordão umbilical participam da formação do lóquio (6), eliminado por até 30 dias. Nos primeiros 2 ou 3 dias o lóquio tem coloração sanguinolenta e torna-se posteriormente mais claro (2). A quantidade do lóquio liberada varia individualmente e quanto mais inodora e incolor for, melhor o prognóstico reprodutivo (16).

Em animais que amamentam e primíparas, a involução uterina é mais rápida e após distocia, partos gemelares, retenção placentária e em animais pluríparas é mais lenta (2, 8).

Desenvolvimento folicular

Para que nova gestação ocorra, é necessário o crescimento de um folículo saudável, com um oócito competente, manifestação de estro, ovulação, fertilização e implantação do embrião (7).

Os fatores que afetam o ressurgimento da onda folicular no pós-parto incluem presença do bezerro, a amamentação e o ECC em bovinos de corte. Já em bovino de leite estes fatores incluem: o balanço energético, ECC, parição, estação do ano e enfermidades, revisado por Crowe (4).

Mesmo sendo possível a indução da ovulação no pós-parto, os efeitos do balanço energético negativo (BEN) associado à amamentação e carência nutricional apresentam-se como os principais fatores determinantes da baixa fertilidade em animais criados extensivamente (17). Isso ocorre, pois, em animais que amamentam, por exemplo, sob influência da mamada, pode ocorrer a produção de um folículo de qualidade inferior e consequente formação de corpo lúteo imaturo (13).

Para que ocorra o retorno regular dos ciclos ovarianos é necessária a recuperação do eixo reprodutivo central (hipotálamo e hipófise). Os mecanismos que controlam o reinício da secreção de LH - que interfere no desenvolvimento folicular e ovulação - incluem principalmente: 1) recuperação da hipófise dos efeitos da alta concentração de estradiol produzido pela placenta; 2) condição nutricional e 3) amamentação (18).

A primeira ovulação em bovinos normalmente é silenciosa (sem sinais de estro) e seguida por ciclo curto (70% dos animais). A anovulação do folículo dominante da primeira onda pós-parto é correlacionada à inconstância dos pulsos de LH associada aos níveis nutricionais (4).

Ciclos ovarianos

Os ciclos ovarianos no pós-parto podem ser classificados com base nos níveis de progesterona no pós-parto de acordo com Shrestha et al. (9). Animais com **ciclo normal**: ovulação antes de 45 dias pós-parto; **anovulação ou ovulação tardia**: ausência da ovulação em mais de 45 dias; **fase luteal prolongada**: ovulação antes dos 45 dias, com um ou mais ciclos com período luteal maior que 20 dias; **fase luteal curta**: ovulação antes dos 45 dias, com um ou mais ciclos com período luteal com menos de 10 dias, exceto para o primeiro ciclo e por fim **cessamento da ciclicidade**: ovulação em menos de 45 dias, com ausência da atividade luteal por no mínimo 14 dias entre a primeira e segunda fase luteal.

Kafi e Mirzaei (10) definiram o retorno da atividade ovariana cíclica no pós-parto como uma ovulação seguida de ciclo ovariano regular de 18-24 dias de duração. Em estudo, atividade cíclica normal condizia com a ovulação ocorrendo antes dos 45 dias pós-parto e atividade anormal caso a ovulação não ocorresse antes dos 45 dias, na ocorrência de ciclos ovarianos irregulares, ocorrência da ovulação em menos de 45 dias acrescido das classificações feitas por Shrestha et al. (9). Animais com essas alterações requerem mais inseminações por concepção e mais dias em aberto. Além do mais, comprovou-se que a perda de score corporal é um fator determinante para a ocorrência de ovulação tardia durante o primeiro e segundo mês pós-parto em bovinos de leite.

Em estudo com 150 taurinos lactantes com o propósito de definir a porcentagem de vacas em cada ciclo ovulatório, Shrestha et al. (9) constataram que apenas 42,9% dos animais apresentaram ciclo ovariano normal enquanto 57,1% apresentaram ciclos anormais, sendo que destes últimos, com maior ocorrência de fase luteal prolongada (35,2%), seguido de anovulação (13,2%). De forma semelhante, Kafi e Mirzaei (10) observaram 45,8% de animais com ciclo ovariano normal, e 54,2% de ciclos anormais com maior frequência de ovulação tardia (35,6%) e fase luteal prolongada (10,1%).

Sendo a síndrome do ciclo estral curto um problema ao retorno da atividade ovariana pós parto, Ferreira et al. (19) avaliaram a dinâmica folicular e intervalos de ciclo de curta duração em fêmeas da raça Gir. Desta forma, foi observada a primeira ovulação pós-parto com no mínimo 26 e máximo 104 dias e intervalo do parto ao primeiro cio fisiológico de 34 dias a 111 dias (mínimo e máximo). O ciclo curto (entre 6 e 12 dias) foi detectado em 86,6% dos animais. A fisiologia nesses animais parece ser a mesma de fêmeas de bovino de corte, nos quais os ciclos curtos são observados em 50 % dos animais acompanhado de lise do corpo lúteo e posterior fase lútea curta em detrimento da alta produção de prostaglandina pelo útero.

Principais fatores que afetam o retorno à ciclicidade

Em animais leiteiros, a demanda nutricional aumenta rapidamente após o parto pela necessidade de produção leiteira, resultando assim em BEN. Desta forma, há mobilização de tecido adiposo e perda de condição corporal, alterando assim a duração do puerpério e do período anovulatório. Esse quadro retarda a primeira ovulação pela inibição dos pulsos de LH, baixa concentração de glicose,

IGF-1 e insulina e que em conjunto restringem a produção de estrógeno pelo folículo (20). Em bovinos de corte o BEN não trás consequências tão marcantes, tendo em vista que a grande quantidade de leite produzida pelos bovinos de leite não é condizente com a realidade produzida pelos bovinos de corte (20, 21).

Sabe-se que o desenvolvimento folicular é dependente dos níveis de insulina, IGF-1, leptina, ácidos graxos não esterificados (AGNEs), hormônio do crescimento (GH), alimentação, anestro, entre outros (7, 22, 23). Também, a ovulação do folículo dominante da primeira onda pós-parto pode ser afetada pela baixa condição corporal, níveis de insulina, IGF-1 e pulsos de LH (8).

Globalmente, evidencia-se redução da fertilidade em animais leiteiros de alta produção em decorrência de sua alta demanda para a produção leiteira. Esse fato, caracterizado como multifatorial, provavelmente está ligado a conflitos entre as necessidades metabólicas e reprodutivas (7).

Conforme revisado por Leroy et al. (7), a preferência para a mobilização energética é dada para manutenção da progênie ao invés da atividade reprodutiva e para tal, uma série de eventos priva o uso de nutrientes para produção leiteira. O úbere é beneficiado pela presença de moléculas transportadoras de glicose, não necessitando da insulina. Na tolerância à glicose, testes mostraram aumento nas concentrações de AGNEs correlacionada com supressão temporária à função pancreática. Também, logo após o parto, a hipoinsulinemia, suprime a produção do hormônio IGF-1 pelo fígado e juntamente com a baixa glicemia suprime a secreção do GnRH. Isso aumenta a produção do GH, que estimula a produção leiteira, ativam a gliconeogênese hepática e a lipólise nos adipócitos. Conjuntamente, as altas concentrações de AGNEs e de GH antagonizam a ação da insulina, aumentando a glicose disponível para produção de lactose.

Os AGNEs acredita-se agirem nas células do folículo ovariano, influenciando o crescimento e desenvolvimento folicular (7). A respeito das concentrações de IGF-1, pressupõe-se que se relacione com o crescimento do folículo dominante da primeira onda pós-parto e module a apoptose e funcionalidade de leucócitos, auxiliando na limpeza uterina, e que a insulina relaciona-se com a maturação e ovulação desse folículo (23, 24).

O BEN em bovinos de leite lactantes é caracterizado por reduzidos níveis plasmáticos de glicose e insulina e elevados de GH. Durante esse período, o fígado fica refratário ao GH e há diminuição do IGF-1 (22), interferindo assim no crescimento folicular.

Após o parto, as concentrações de hormônios esteróides reduzem a níveis basais e há aumento dos níveis plasmáticos do hormônio folículo estimulante por volta do 3^o- 5^o dia, o que induz à emergência da primeira onda folicular pós-parto ao redor do 7^o-10^o dia e seleção do folículo dominante 10^o-12^o dias (4, 6). A maior secreção do estrógeno pelo folículo em crescimento e o aumento da insulina auxilia na maturação e ovulação (23).

A condição corporal no pós-parto influencia na ovulação, correlacionando assim um bom escore corporal com a ocorrência da ovulação (23). Conforme revisado por Crowe (4), 30 a 80% dos animais leiteiros em bom estado corpóreo ovulam na primeira onda pós-parto (~15 dias), enquanto que animais de corte com bom estado corporal podem ovular na terceira ou quarta onda e animais em má condição podem ovular após a 10^a onda.

Sabe-se que a ovulação e o comportamento de estro podem ser atrasados em detrimento da amamentação (3) prolongando o intervalo do parto ao próximo cio em vacas leiteiras (30 a 72 dias) e de corte (46 a 104 dias) (2). Por quase meio século acreditou-se que a amamentação representava a principal causa de anovulação no pós-parto. Entretanto, hoje se sabe que não apenas o fato da amamentação, mas também a percepção visual, auditiva e olfatória influenciam na produção de GnRH pelo hipotálamo (12), reduzindo os níveis de LH. Segundo Lamb et al. (25), para que a amamentação interfira no anovulação, é necessário que a vaca primeiramente reconheça e crie laços com sua cria e que a mesma mame pelo menos duas vezes ao dia. Adicionalmente, acredita-se que parte da ação inibitória da amamentação esteja também correlacionada com os opióides endógenos, especialmente às β endorfinas, os quais diminuem a pulsatilidade de GnRH e consequentemente de LH (26).

O anestro pós-parto é uma importante causa de não retorno a ciclicidade. A ausência de pulsos de GnRH, inadequada secreção das gonadotrofinas e consequente inatividade ovariana caracterizam o quadro de anestro (12). Esse quadro ocorre em virtude da incapacidade do folículo dominante em produzir estradiol suficiente para indução da ovulação em detrimento da baixa frequência do pulso de LH (8). Esse período é visto como um evento fisiológico após o parto, todavia torna-se patológico quando excede o tempo esperado (27), afetando a fertilidade pós-parto por aumentar o intervalo parto - primeiro cio, reduzir a produção de bezerro e consequentemente gerar perdas econômicas (28, 29).

Enfermidades uterinas

Geralmente a contaminação uterina ocorre durante o parto e pode levar ao desenvolvimento de infecções uterinas no pós-parto (30). Em bovinos leiteiros, por exemplo, a diminuição na ingestão alimentar no período pré-parto e o aumento da demanda energética para produção leiteira modificam o estado nutricional e imunológico, o que pode favorecer a instalação de uma infecção uterina (31).

Sendo comum, cerca de 80-100% dos animais apresentam contaminação bacteriana uterina nas primeiras duas semanas pós-parto e 40% dos animais continuam neste quadro por mais uma semana. A contaminação, que pode causar infecções uterinas dependendo do status imunológico do animal, pode ser originada pela presença viral (*Herpesvirus bovino* tipo 4) e bacteriana (*Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella*) (6, 24).

Os danos ao endométrio e a falha na atividade ovariana são as causas da infertilidade na ocorrência de doenças uterinas (6). Isso, pois, com ambiente uterino inadequado pode ocorrer fase lútea prolongada e falha na ovulação em virtude da infecção uterina prevenir e/ou suprimir a liberação da prostaglandina pelo endométrio e seu transporte para o ovário. Desta forma, os animais emprenham tardiamente (9) mostrando baixo desempenho reprodutivo.

Em bovinos de corte, a retenção de placenta, metrite e endometrite consistem nas principais afecções que cursam com grandes prejuízos econômicos (32).

Abordagem diagnóstica e terapêutica no puerpério

As enfermidades uterinas pós-parto podem ser classificadas com base na fase de ocorrência e sinais clínicos como: 1- metrite puerperal a qual é diagnosticada dentro de 21 dias, na presença de descarga fétida vermelho amarronzada, aumentado uterino, sinais sistêmicos e febre; 2- metrite clínica na qual a sintomatologia da metrite puerperal é presente, mas na ausência de sinais sistêmicos; 3- endometrite clínica que aparece normalmente com a cérvix aberta permitindo a drenagem de conteúdo uterino purulento (>50% de pus) por 21 dias ou mais, ou mucopurulento (50% de pus, 50% muco) após 26 dias; 4- endometrite subclínica presente na ausência da clínica, com >18% (entre 21-33 dias) ou >10% (entre 34-47 dias) de neutrófilos na citologia e 5- piometra na qual, na presença de um corpo lúteo persistente e cérvix fechada, há o acúmulo de material purulento no interior uterino. Diferenciando-se a metrite e endometrite, tem-se que a primeira, considerada mais grave, atinge camadas mais profundas uterinas, enquanto a segunda, sendo mais localizada, não (6).

As doenças podem ser diagnosticadas por: 1- análise do muco vaginal, 2- vaginoscopia (6) e 3- isolamento bacteriano que pode ser feito por *swabs* (mais prático e barato) ou biópsias endometriais (24).

A análise do muco vaginal é uma das abordagens mais importantes para o diagnóstico de enfermidades uterinas. Sabe-se que sua característica no pós-parto reflete a carga bacteriana uterina, sendo que a secreção vaginal patológica reflete a densidade de crescimento de bactérias específicas no útero (30, 33).

De acordo com o estudo conduzido por Rocha et al. (34), evidenciou-se que há redução no isolamento bacteriano do muco vaginal, sendo maior nas primeiras duas semanas, com o decorrer do puerpério e que esses cultivos correlacionam-se com a microbiota uterina.

A abordagem terapêutica depende da infecção observada. Na endometrite e piometra, a protaglandina pode ser utilizada associada com antibioticoterapia para estimular a contratilidade, evitar o acúmulo de conteúdo intrauterino e provocar a luteólise. Na metrite puerperal, medicamentos que aumentem a contratilidade e a antibioticoterapia sistêmica, quando há comprometimento de outros sistemas, são indicados. Aconselha-se ainda, o tratamento local com altas doses de oxitetraciclina (2-4 g/dia por 3-5 dias), medicamento de baixo custo, alta atividade antimicrobiana e boa eficácia (35).

Em estudo, comparou-se a eficácia da administração de oxitetraciclina pela via intrauterina e intramuscular. Evidenciou-se que ambas as vias de administração foram eficazes, mas a intrauterina foi mais econômica e efetiva em reduzir o intervalo do tratamento ao primeiro estro e inseminação (35). Entretanto, o uso de drogas irritantes como é o caso da oxitetraciclina podem causar lesões endometriais, além de se fazer necessário o descarte do leite com resíduos. Analisando-se por este lado, a via sistêmica torna-se mais vantajosa (30).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Objetivando-se a melhora na fertilidade dos animais, o conhecimento das alterações que ocorrem no útero durante o parto e puerpério auxiliam no reconhecimento precoce de anomalias que possam interferir no retorno à ciclicidade ovariana e restabelecimento da função uterina.

É importante ressaltar que é essencial para o aprimoramento da bovinocultura o conhecimento dos mecanismos fisiológicos, fisiopatológicos e endócrinos no puerpério, a fim de se obter o rápido retorno da atividade ovariana e, por sua vez a maximização da produção mediante ao alcance do objetivo econômico da exploração um parto/vaca/ano.

REFERÊNCIAS

1. Hafez ESE, Hafez B. Reprodução animal. São Paulo: Manole; 2004.
2. Prestes NC, Landim-Alvarenga FC. Obstetrícia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
3. Ball PJH, Peters AR. Reproduction in cattle. Grã Bretanha: Blackwell; 2004.
4. Crowe MA. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 2008;43:20-8.
5. Shrestha HK, Nakaoa T, Higakib T, Suzukib T, Akitac M. Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high-producing Holstein cows. *Theriogenology.* 2004;61:637-49.
6. Sheldon IM, Williams EJ, Miller ANA, Nash DM, Herath S. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J.* 2008;176:115-21.
7. Leroy JLMR, Vanholder T, Van Knegsel ATM, Garcia-Ispuerto I, Bols PEJ. Nutrient Prioritization in dairy cows early postpartum: mismatch between metabolims and fertility? *Reprod Domest Anim.* 2008;43:96-193.

8. Roche JF. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci.* 2006;96:282-96.
9. Shrestha HK, Nakao T, Suzuki T, Higaki T, Akita M. Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period postpartum on subsequent reproductive performance of high-producing Holstein cows. *Theriogenology.* 2004;61:1559-71.
10. Kafi M, Mirzaei A. Effects of first postpartum progesterone rise, metabolites, milk yield, and body condition score on the subsequent ovarian activity and fertility in lactating Holstein dairy cows. *Trop Anim Health Prod.* 2010;43:761-7.
11. Horta AEM. Fisiologia do puerpério na vaca. In: *Anais das 8as Jornadas Internacionais de Reproducción Animal*; 1995, Portugal. Portugal: Santader: AERA; 1995. p.73-84.
12. Senger PL. *Pathways to pregnancy and parturition.* United States of America: Cadmus Professional Communications; 2003.
13. Emerick LL, Dias JC, Souza FA, Vale Filho VR, Andrade VJ. Retorno da atividade ovariana luteal cíclica de vacas de corte no pós-parto: uma revisão. *Rev Bras Reprod Anim.* 2009;33:203-13.
14. Wiltbank MC. Prevention and treatment of retained placenta. In: *Proceedings of the Intermountain Nutrition Conference Dairy Nutritional Strategies to Meet Economic and Environmental Challenges*; 2008, Salt Lake City. Logan: Utah State University; 2008. p.81-92.
15. McNaughton AP, Murray RD. Structure and function of the bovine fetomaternal unit in relation to the causes of retained fetal membranes. *Vet Rec.* 2009;165:615-22.
16. Noakes DE, Parkin-On TJ, England GCW. *Arthur's Veterinary reproduction and obstetrics.* London: Saunders; 2001.
17. Moraes JCF, Souza CJH, Jaume CM. Requerimentos para uso de tratamentos hormonais e desmame temporário no controle da reprodução de vacas de corte com cria ao pé. *Acta Sci Vet.* 2009;37:113-8.
18. Williams GL, Amstalden M. Understanding postpartum anestrus and puberty in the beef female [Internet]. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle.* San Antonio, TX; 2010 [cited 2012 Mar 10] Available from: http://www.appliedreprostrategies.com/2010/January/pdfs/Gary_Williams.pdf
19. Ferreira MB, Lopes BC, Azevedo NA, Fernandes LO, Ribeiro SHA, Marques Júnior CA, et al. Atividade ovariana pós-parto e ciclo curto em multíparas *Bos indicus* da raça Gir leiteira. In: *Anais do 17º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*; 2007, Curitiba. Belo Horizonte: CBRA; 2007. p.16.
20. Butler ST. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 2000;60:449-57.

21. Lamb GC. Influence of nutrition on reproduction in the beef cow herd [Internet]. Saint Paul: University of Minnesota; 2012 [cited 2012 Mar 13] Available from: <http://www.extension.umn.edu/beef/components/publications/bcmu48.pdf>
22. Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J Endocrinol.* 2003;176:205-17.
23. Kawashima C, Fukihara S, Maeda M, Kaneko E, Montoya CA, Matsui M, et al. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction.* 2007;133:155-63.
24. Földi J, Kulcsár M, Pécsi A, Huyghe B, Sa C, Lohuis JACM, et al. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2006;96:265-81.
25. Lamb GC, Miller BL, Lynch JM, Thompson KE, Heldt JS, Loest CA, et al. Twice daily suckling but not milking with calf presence prolongs postpartum anovulation. *J Anim Sci.* 1999;77:2207-18.
26. Oliveira JFC, Gonçalves PBD, Ferreira R, Gasperin B, Siqueira LC. Controle sobre GnRH durante o anestro pós-parto em bovinos. *Cienc Rural.* 2010;40:2623-31.
27. Gregory JW. Fisiopatologia do anestro pós-parto em bovinos de corte [monografia]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
28. Yavas Y, Walton JS. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology.* 2000;54:25-55.
29. Brauner CC, Pimentel MA, Lemes JS, Pimentel CA, Moraes JCF. Desempenho reprodutivo pós-parto de vacas de corte submetidas a indução/sincronização de cio. *Rev Bras Med Vet.* 2009;38:99-103.
30. Marques Júnior AP, Martins TM, Borges AM. Abordagem diagnóstica e de tratamento da infecção uterina em vacas. *Rev Bras Reprod Anim.* 2011;35:293-8.
31. Sordillo LM, Contreras GA, Aitken SL. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim Health Res Rev.* 2009;10:53-63.
32. Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod Domest Anim.* 2009;44:1-9.
33. William EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GCW, Noakes DE, Dobson H, et al. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology.* 2005;63:102-17.

34. Rocha AL, Gambarini ML, Andrade MA, Oliveira Filho BD, Gomes FA. Microbiota cérvico-vaginal durante o final de gestação e puerpério em vacas Girolando. Cienc Anim Bras. 2004;5:215-20.
35. Santos ADF, Costa EP, Guimarães JD, Rovay H, Torres CAA, Caldas ELC. Tratamento de endometrite bovina pós-puerperal pelas vias intramuscular e intrauterina. Cienc Anim Bras. 2009;10:602-9.

Recebido em: 19/08/2012

Aceito em: 30/01/2014

SEPSE EM FELINOS

Fernanda Chicharo Chacar¹
Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães-Okamoto²
Alessandra Melchert²
Vanessa Kutz de Arruda¹
Daniel Diola Bento¹
Denis Carvalho Costa¹

RESUMO

Sepse, definida pela síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) secundária a um agente infeccioso, é uma afecção comum em felinos e está relacionada a altos índices de morbidade e mortalidade nesta espécie. Suas principais causas em gatos são piotórax e peritonite séptica. Devido às suas peculiaridades anatomofisiológicas, os felinos reagem de maneira singular a sepse, apresentando bradicardia, hipotensão e hipotermia, sinais que compõem a “tríade da morte dos felinos”. Os principais mediadores inflamatórios da sepse nesta espécie são TNF, IL-10, IL-6 e CXCL-8. O diagnóstico de sepse ou sepse grave é baseado principalmente nos achados clínicos. O tratamento desta síndrome na espécie felina deve ser baseado na técnica de “Terapia guiada por metas” (*Goal-directed-therapy*), que envolve o manejo e monitoramento intensivo da hemodinâmica em pacientes de alto risco. Embora a sepse cause altos índices de morbimortalidade em felinos, poucos estudos a cerca de sua etiologia, fisiopatologia, alterações hemodinâmicas e metabólicas estão disponíveis. Maiores esforços da comunidade veterinária são necessários para a compreensão desta complexa síndrome em gatos, pelas suas peculiaridades e o aumento da casuística destes animais no Brasil nos últimos tempos.

Palavras-chave: SRIS, gatos, choque séptico, fisiopatologia

SEPSIS IN CATS

ABSTRACT

Sepsis, defined as the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) due to an infectious agent, is a common condition in cats and it is related to high morbidity and high mortality in this specie. Its main causes are pyothorax and septic peritonitis in felines. Due to its anatomical and physiological peculiarities, cats react uniquely to sepsis, presenting bradycardia, hypotension and hypothermia, signs that compound the "Shock triad in cats." The main inflammatory mediators of sepsis in this specie are TNF, IL-10, IL-6 and CXCL-8. The diagnosis of sepsis or severe sepsis is mainly based on clinical findings. The treatment of this syndrome in feline specie should be based on the “Goal-directed therapy”, wich involves intensive monitoring and aggressive management of hemodynamics in patients at high risk. Although sepsis causes high rates of morbidity and mortality in cats, few studies about the etiology, pathophysiology, hemodynamic and metabolic changes are available. Greater efforts are needed by the veterinary community to understand this complex syndrome in cats, due to its peculiarities and due to its increase population in Brazil in the last times.

Keywords: SIRS, cats, septic shock, pathophysiology

¹ Residente do Departamento de Clínica Veterinária, Clínica Médica de Pequenos Animais, FMVZ-Unesp-Botucatu

² Professora Assistente Doutora do Departamento de Clínica Veterinária de Pequenos Animais, FMVZ-Unesp-Botucatu - Correspondência

SEPSIS EN FELINOS

RESUMEN

La sepsis, definido como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) secundario a un agente infeccioso, es una condición común en gatos y se relaciona con una alta morbilidad y mortalidad en esta especie. Sus causas principales son piotórax y peritonitis séptica. Debido a su anatomía y peculiaridades fisiológicas, los gatos reaccionan únicamente a la sepsis, con signos de bradicardia, hipotensión e hipotermia, conocida como "tríada de la muerte de los gatos." Los principales mediadores inflamatorios de la sepsis en esta clase son el TNF, IL-10, IL-6 y 8-CXCL. El diagnóstico de la sepsis o sepsis severa se basa principalmente en los hallazgos clínicos. El tratamiento de este síndrome en especies felinas se debe basar en la técnica de "metas de la terapia guiada" (objetivo dirigido a la terapia), lo que implica un manejo intensivo y el control de la hemodinámica en los pacientes de alto riesgo. A pesar de la sepsis provocar altas tasas de mortalidad en los gatos, pocos estudios acerca de la etiología, fisiopatología, hemodinámica y los cambios metabólicos están disponibles. Se requieren mayores esfuerzos de la comunidad veterinaria para entender este complejo síndrome en los gatos, debido a sus peculiaridades y el aumento del tamaño de la muestra de estos animales en Brasil en los últimos tiempos.

Palabras clave: SRIS, gatos, shock séptico, fisiopatología

INTRODUÇÃO

A Sepse, definida pela síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) secundária a um agente infeccioso, é uma afecção comum em felinos, e está relacionada a altos índices de morbidade e mortalidade (29% a 79%) nesta espécie (1). Peritonite séptica, abscessos hepáticos, piotórax, bacteremia, pneumonia, endocardite, pielonefrite, piometra, pancreatite séptica e meningite tem sido apontadas como causas de sepse em gatos (2, 3). Contração esplênica ineficaz, pulmões de menor complacência e mais sensíveis à hipoxemia, fibras vagais associadas às simpáticas, reação adrenérgica débil e maior suscetibilidade à hipotermia, são propriedades anatomofisiológicas dos felinos, que conferem-lhes resposta peculiar à sepse, quando comparada às demais espécies (4, 5).

O diagnóstico da sepse no paciente felino é desafiador, devido à singularidade e inespecificidade de seus sinais clínicos nesta espécie. O seu reconhecimento precoce, aliado à instituição de antibióticos adequados e cuidados intensivos de suporte para a manutenção da perfusão tecidual, são referidos como componentes críticos da terapia, e de prognóstico (3). Embora seja, sabidamente, uma importante causa de mortalidade em gatos, há poucos estudos a respeito da sepse em felinos (2, 4). Diante desta dificuldade, o presente estudo objetiva revisar os aspectos da sepse na espécie felina, além de discutir as principais diferenças de sua fisiopatologia em comparação às espécies humana e canina.

NOMENCLATURA E CONCEITOS ATUAIS

Sepse (putrefação), na Grécia Antiga, referia-se à enfermidade ou morte (6). Apesar de há muito ser descrita na ciência médica, o conceito atual de sepse foi concebido somente em 1992, quando a ACCP (*The American College of Chest Physicians*) e SCCM (*Society of Critical Care Medicine*) publicaram o consenso intitulado "Definições de Sepse e Falência de Órgãos e Diretrizes para o Uso de Terapias Inovadoras na Sepse", no qual denominaram sepse como síndrome da resposta inflamatória sistêmica secundária a bactérias, vírus, fungos ou parasitos (7).

A Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), por sua vez, é a manifestação clínica da reação inflamatória decorrente de eventos infecciosos (sepse) ou não infecciosos (trauma, queimaduras, “heatstroke”, pancreatite, doenças imunomediadas) (8).

As manifestações clínicas previstas na SRIS são taquicardia ou bradicardia, taquipnéia, febre ou hipotermia, leucocitose ou leucopenia (3). O paciente felino em SRIS apresenta, no mínimo, três dos quatro parâmetros acima descritos, ou seja, temperatura retal acima de 39,7°C ou menor que 37,8°C; frequência cardíaca maior que 225 batimentos por minutos (bpm) ou menor que 140 bpm; frequência respiratória maior que 40 movimentos respiratórios por minuto (mpm); leucocitose maior que 19.500/ μ L ou leucopenia abaixo de 5.000/ μ L (4).

Em 2001, a comunidade científica realizou um segundo consenso a cerca das definições em sepse. O reconhecimento da SRIS passou a ser realizado não somente com base nas manifestações clínicas e parâmetros físicos, mas em associação aos sinais biológicos de inflamação, parâmetros hemodinâmicos, sinais de alteração da perfusão tecidual e sinais de disfunção orgânica. Criou-se então, o sistema PIRO (predisposição, infecção, resposta e disfunção orgânica) para estadiamento da sepse, que utiliza parâmetros clínicos e laboratoriais para classificar o paciente, além de avaliar o risco e prever o prognóstico, bem como facilitar os estudos a partir de um grupo mais homogêneo de pacientes (9).

A predisposição à sepse relacionada à raça ou sexo, não foi verificada em felinos. No entanto, em cães, raças como Rottweilers e Doberman, predispostas a parvovirose, possuem leucócitos mais reativos, apresentando maior resposta inflamatória. Os gatos positivos para o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e para o Vírus da Leucemia Felina (FeLV), ou que estejam em quimioterapia, são predispostos à sepse. Infecções em felinos como piotórax, peritonite séptica, endocardite, pielonefrite, osteomielite, piometra e trauma por mordedura são as causas mais frequentes de sepse (3). Felinos apresentam hipotermia, bradicardia, hipotensão, taquipnéia e anemia em resposta à sepse (4). A disfunção orgânica mais evidente em felinos é pulmonar, ao contrário dos cães, nos quais é gastrointestinal (3).

A disfunção orgânica, ou síndrome de disfunção múltipla de órgãos (SDMO) é caracterizada pela presença de alteração na função de órgãos num paciente com enfermidade aguda de maneira tal que a homeostase não possa ser mantida sem intervenção médica (10).

A sepse grave é descrita como sepse associada à disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão. O choque séptico refere-se à falência circulatória aguda caracterizada por hipotensão arterial persistente, refratária a reposição volumétrica por fluidos (4). A resposta dos gatos ao choque séptico é diferente das demais espécies. Eles apresentam hipotensão, bradicardia e hipotermia, sinais que caracterizam a “tríade da morte dos felinos” (11).

FISIOPATOLOGIA

A Sepse é uma afecção comum nos pacientes felinos e tem sido associada a índices significativos de morbidade e mortalidade nesta espécie. Há poucos estudos sobre a fisiopatologia desta síndrome em gatos (2).

Os principais fatores envolvidos na sepse são os agentes etiológicos e a resposta do hospedeiro, a qual pode favorecer a progressão da sepse, caso haja presença de superantígenos e resistência à opsonização, à fagocitose e aos antibióticos (12).

A fisiopatologia da sepse é complexa. Participam o sistema imune, os mecanismos inflamatórios e a cascata de coagulação, com conseqüente interferência na homeostasia. A evolução da sepse ocorre em cinco fases, iniciada pela agressão local, causada por antígeno, seguida da reação do hospedeiro. Posteriormente, ocorre a sistematização da inflamação. O predomínio de mediadores pró-inflamatórios ocasionam a SRIS e suas manifestações clínicas características. Esta, por sua vez, leva a ativação simultânea de mecanismos compensatórios de contrarregulação (CARS-Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome). Por fim, ocorre a dissonância imunológica, definida pelo desequilíbrio entre os processos pró e

antiinflamatórios. Este desequilíbrio promove a progressão da resposta imunológica à infecção, envolvendo desta forma, demais órgãos e tecidos saudáveis, o que pode culminar na Síndrome da Disfunção Múltipla de órgãos (SDMO) (13).

Resposta Imunoinflamatória e Coagulação

A resposta imunológica do hospedeiro à infecção é uma associação entre a resposta adquirida e a inata. A primeira está relacionada diretamente com a memória imunológica, isto é, os receptores antígenos-específicos são criados a partir do contato com patógenos em momentos anteriores. A imunidade inata, por sua vez, está associada à resposta do hospedeiro contra componentes moleculares específicos de patógenos invasores, tais como os LPS (lipopolissacarídeos), peptídeoglicanos, glicolipídeos e RNA de vírus (14).

Acredita-se que a resposta imune inata desempenhe papel fundamental na sinalização da inflamação e, portanto, no início da reação imunoinflamatória. Cerca de sessenta por cento dos casos de sepse nas Unidades de Terapia Intensiva humanas são causadas por bactérias gram-negativas, as quais produzem endotoxinas (LPS). Uma proteína plasmática específica, LBP (*LPS-binding protein*), associa-se à LPS, formando um complexo, e liga-se ao receptor de membrana de células endoteliais, e de macrófagos, componentes da resposta imune inata. Inicia-se, então, a transdução de sinais inflamatórios intracelulares por intermédio de um mecanismo receptor específico: TLR (*Toll-like receptor*) (14). Os TLRs são atualmente reconhecidos como os principais receptores das células do sistema imune inato para patógenos microbianos. Recentemente também foram encontrados em vários órgãos, a exemplo dos rins. A distribuição celular e o papel dessas proteínas ainda são pouco conhecidos, mesmo em medicina (15).

Uma vez iniciada a resposta inflamatória, o endotélio vascular desempenha papel fundamental, dirigindo os elementos celulares, especialmente os leucócitos, para o sítio da infecção (14). Os leucócitos, juntamente às células residentes, liberam citocinas, tais como a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF- α), a IL-8 e quimiocinas, que por sua vez, promovem o recrutamento de mais leucócitos para o sítio inflamatório, bem como sua ativação, com conseqüente aumento da atividade microbicida (16). As citocinas, glicoproteínas solúveis de baixo peso molecular, são elementos chave na resposta inflamatória da sepse. Elas são reguladas por mediadores pró e antiinflamatórios (17).

O TNF- α é um mediador produzido na fase inicial da resposta inflamatória em resposta a vários estímulos. Esta citocina ativa a cascata de inflamação, promovendo permeabilidade das células endoteliais, liberação de neutrófilos pela medula óssea, apoptose linfocitária, redução das proteínas de fase aguda e piroxia. Em estudo realizado em felinos sépticos, a endotoxina LPS induziu a produção de TNF. No entanto, a concentração plasmática desta citocina não foi relacionada a um prognóstico ruim nesta espécie, ao contrário dos cães com parvovirose, cuja concentração de TNF está relacionada à mortalidade (1). Em humanos, a redução dos níveis séricos de TNF- α está associado ao aumento da sobrevivência no choque séptico. Esta citocina, e a IL-1 β , estimulam a liberação sistêmica de IL-6 e IL-8, amplificando, desse modo, a resposta inflamatória (17). Gatos sépticos possuem maior produção de IL-1 β do que aqueles com SRIS ou saudáveis. A atividade plasmática desta interleucina está associada à mortalidade em felinos e, portanto, a um prognóstico desfavorável. Desta forma a interleucina IL-1 β deve ser avaliada como um biomarcador de sepse nesta espécie (1). A IL-8 é um potente agente quimiotático e ativador de neutrófilos, capaz de ampliar a resposta inflamatória pela indução da liberação de radicais livres e enzimas proteolíticas. No foco infeccioso, a IL-8 leva ao recrutamento de neutrófilos para o local, contribuindo para a eliminação dos micro-organismos (16).

Em felinos, a endotoxina LPS além de induzir à produção de TNF, também acarretou o aumento dos mediadores proinflamatórios IL-10, IL-6 e CXCL-8. Estas duas últimas são mediadores inflamatórios tardios na sepse e são produzidos em resposta aos mediadores

iniciais, como TNF- α e IL-1 β , e às LPSs, podendo persistir no plasma por longos períodos. A IL-6 ainda está envolvida nas manifestações clínicas da sepse, como pirexia, produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B, disfunção na barreira gastrointestinal e alteração homeostática (2). Além disto, esta interleucina promove a reprogramação da expressão gênica hepática, a chamada “resposta de fase aguda”, caracterizada pela produção de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa e a supressão das proteínas negativas de fase aguda, como a albumina (12).

O aumento na concentração sérica deste mediador está relacionado a um prognóstico ruim tanto em felinos, quanto em caninos sépticos, no entanto, maiores estudos são necessários para realmente determinar se a IL-6 pode funcionar como um biomarcador para sepse em gato (1). O principal papel da quimiocina CXCL-8 é recrutar e ativar neutrófilos. Altas concentrações séricas deste mediador, e também da IL-6, estão relacionados com um prognóstico ruim em humanos sépticos. Em felinos, entretanto, não é conclusivo que esta quimiocina possa ser utilizada como um biomarcador prognóstico, sendo necessários maiores estudos (1).

O óxido nítrico (NO) está presente, normalmente, no miocárdio e no endotélio vascular. Ele é gerado pela enzima NO sintetase constitutiva. A exposição à endotoxina lipopolissacáridea (LPS) ou ao mediador TNF leva a indução da isoforma cálcio-independente NO sintetase, denominada NO sintetase induzida, a qual promove produção intensa de NO, contribuindo assim para a vasodilatação e resistência aos vasoconstritores do choque séptico. A endotoxina também induz síntese de NO no músculo liso venoso, além do miocárdio, contribuindo para a diminuição do retorno venoso e disfunção do miocárdio⁶. Além de causar depressão miocárdica, o NO também pode ocasionar injúrias pulmonares pela formação de peroxinitrito, um agente oxidante, por estímulo de mediadores inflamatórios; efeitos não oxidantes do NO podem levar a lesão pulmonar aguda. No intestino, em condições inflamatórias, a superprodução de NO leva à lesão da mucosa, hiperemia e quebra da barreira, propiciando à translocação bacteriana. Desta maneira o processo séptico pode se iniciar ou perpetuar-se (18).

Dentre as citocinas antiinflamatórias, a IL-10 inibe a liberação dos mediadores próinflamatórios, como IL-1b, IL-6 e TNF- α , a partir de monócitos/macrófagos, impedindo desta forma, possíveis danos teciduais. A IL-10 induz a produção de outras citocinas antiinflamatórias, a exemplo do IL-1ra, receptor antagonista da IL-1, mediador próinflamatório. Estudos vem apontando o uso da IL-10 como uma alternativa na terapia contra a sepse (17).

Além das citocinas, os mediadores lipídicos, (prostaglandinas, fator de ativação plaquetário e leucotrienos) e os componentes plasmáticos (cininas, fatores da coagulação e complemento) também participam da fisiopatologia da sepse (16).

As prostaglandinas (PGs) promovem vasodilatação em resposta à hipóxia (19); o fator de ativação plaquetário é um potente vasodilatador na maioria dos vasos, mas causa vasoconstrição nos vasos pulmonares, renais e coronários. Outros efeitos incluem: aumento da permeabilidade vascular, estímulo à agregação plaquetária, ativação da liberação de histamina e serotonina, promoção da agregação neutrofílica e sua degranulação, hipotensão e depressão miocárdica; o ácido araquidônico é liberado dos fosfolípídeos celulares e participa da via da ciclooxigenase ou da via da lipooxigenase, resultando na formação de prostaglandinas e tromboxano, ou leucotrienos, respectivamente (20). O fator XII (fator de Hageman) é ativado por endotoxinas, e desencadeia a cascata de coagulação, com conseqüente hipóxia tecidual e liberação de prostaglandinas, as quais amplificam o processo inflamatório. O fator XII também ativa a cascata das cininas que contribuem para a gênese dos sinais da inflamação. Este mesmo fator ainda é capaz de acionar o sistema fibrinolítico, responsável por manter a balança homeostática “coagulação-fibrinólise”, pela ativação da plasmina tecidual (AP-t), numa tentativa de impedir danos maiores aos tecidos (19).

A endotoxina, entre outros mediadores proinflamatórios, como fator de necrose tumoral (TNF- α), lipoproteínas e fator de crescimento, podem estimular a expressão de outro fator, denominado fator III ou fator tecidual, nas células endoteliais e nos monócitos circulantes. Sua liberação intravascular é o mecanismo primário da inflamação, indutor da cascata de coagulação (21). Em felinos, a endotoxina LPS não está associada às alterações de coagulação (2).

O fator tecidual, em evidência nos quadros de sepse, é o principal inibidor da formação de trombina, tanto em condições fisiológicas, como patológicas. A anti-trombina III é uma protease inibidora, produzida no fígado e encontrada no plasma, e em menor proporção, na superfície das células endoteliais e plaquetas. Sua redução em humanos e animais em sepse está correlacionada à morbidade e menor sobrevida (21).

A inflamação aguda, tal qual é vista na sepse, acarreta a ativação sistêmica da cascata de coagulação e pode ocasionar coagulação intravascular disseminada (CID), na qual ocorre oclusão dos vasos sanguíneos devido à formação de trombos; acredita-se que esta condição esteja relacionada à Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos (SDMO). A ativação persistente do sistema de coagulação pode levar ao consumo de plaquetas e de fatores de coagulação. O aumento da ativação destes fatores promove efeitos próinflamatórios, como aumento das citocinas e ativação dos leucócitos, da mesma forma que a ativação de fatores anti-coagulantes leva a efeitos antiinflamatórios, incluindo a redução de citocinas e menor adesão leucocitária (21).

A coagulação intravascular disseminada (CID) acarreta um estado protrombótico, mas, devido ao consumo dos fatores de coagulação e de plaquetas, o paciente apresenta simultaneamente tendências hemorrágicas (21). Sepse e SRIS são as causas mais comuns de coagulação intravascular disseminada (CID) em cães e humanos (22). No entanto, em felinos, é o linfoma. Outras causas menos frequentes nesta espécie incluem carcinoma, pancreatite, sepse e enfermidades infecciosas. Em gatos, CID está associada a altos índices de mortalidade (23).

Alterações Metabólicas e Síndrome de Disfunção Múltipla de Órgãos (SDMO)

A Síndrome de Disfunção Múltipla de Órgãos (SDMO) é caracterizada pela falência de dois ou mais órgãos, com conseqüente incapacidade da manutenção da homeostase, sem intervenção médica (24).

Os mecanismos precisos que levam à disfunção orgânica na sepse não estão completamente elucidados, e podem ser classificados em sistêmicos e órgão-específicos (12).

Entre os mecanismos sistêmicos destacam-se as alterações na função vascular e no metabolismo da glicose. A função vascular é afetada pela combinação de inúmeros fatores, como hipovolemia e vasoplegia, os quais, por sua vez, são influenciados principalmente pela produção excessiva de óxido nítrico, ativação dos canais de potássio e alterações nos níveis de hormônios, como a vasopressina e o cortisol (12). O cortisol é liberado pela estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) em situações estressantes ao organismo, como na sepse, e exerce efeitos cardiovasculares sobre a pressão arterial, ao aumentar a síntese e expressão de receptores adrenérgicos; imunológicos, pela produção de citocinas e mediadores antiinflamatórios; metabólicos, tais como hiperglicemia, ao estimular a gliconeogênese hepática, ao inibir a utilização periférica de glicose, ao promover lipólise e ao induzir à resistência insulínica (13).

O comprometimento da síntese e liberação do cortisol, ou/e a resistência periférica aos seus efeitos é atualmente denominada CIRCI (Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency) (13) e ocorre em felinos sépticos ou com SRIS secundária a trauma (25). A falha do organismo em responder adequadamente ao estresse indica injúria no eixo

hipotálamo-hipófise-adrenal, o que pode comprometer a capacidade do paciente em lidar com a enfermidade, neste caso, sepse (26).

Alterações metabólicas, como hiperglicemia e hiperlactatemia, estão relacionadas à sepse em felinos, causada por endotoxina LPS (2). No paciente crítico, a hiperglicemia é causada pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que aumenta a produção hepática de glicose e inibe a captação de glicose mediada pela insulina para o músculo esquelético (27). A hiperlactatemia é decorrente da oferta inadequada de oxigênio aos tecidos devido à queda do fluxo sanguíneo nos capilares e da redução do débito cardíaco, o que contribui para o aumento do metabolismo anaeróbico (12). Em gatos, a concentração sérica de lactato é de 1,2 a 3,7 mmol/L (28).

Quanto aos mecanismos órgão-específicos, o sistema cardiovascular é um dos mais afetados na sepse grave e no choque séptico, devido à depressão miocárdica pelo efeito das citocinas, óxido nítrico, entre outros (12). Os pulmões são envolvidos precocemente no processo inflamatório que ocorre na sepse, especialmente em felinos (2). Nesta espécie, sepse grave tem sido associada à Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) em achados de necropsia (29). Desta forma, pode-se dizer que os pulmões são considerados o “órgão do choque em gatos”, ao contrário dos cães, que apresentam primariamente lesão em trato gastrointestinal. Os felinos em sepse são particularmente sensíveis à sobrecarga de volume, ao edema pulmonar e à efusão pleural. O comprometimento pulmonar está associado ao aumento da permeabilidade vascular, a disfunção miocárdica e a redução da pressão oncótica devido a hipoalbuminemia (3).

O sistema hepatoesplênico pode ser acometido diretamente, podendo ainda afetar outros sistemas à distância, pela produção hepática das proteínas de fase aguda. Os achados clínicos de disfunção hepática ocorrem tardiamente na sepse, e quando presentes são indicativos de mau prognóstico (12). A avaliação histopatológica de felinos com sepse ocasionada por endotoxina LPS revela necrose hepática centrolobular (2).

A hipoperfusão renal e a lesão inflamatória na sepse resultam em isquemia e disfunção tubular renal. Ocorre oligúria progressiva, com queda da taxa de filtração glomerular, com conseqüente elevação de creatinina. A instalação do quadro de insuficiência renal aumenta muito a morbimortalidade (30).

O cérebro é sensível à presença dos micro-organismos e à inflamação. O sistema nervoso simpático e a via antiinflamatória colinérgica afetam outros órgãos e sistemas pela estimulação neuroendócrina (12).

DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico de sepse ou sepse grave é baseado principalmente nos achados clínicos (4). Os sinais clínicos clássicos descritos na fase inicial da sepse, denominada hiperdinâmica, são: taquicardia, febre e mucosas congestas. A fase tardia, ou hipodinâmica, é caracterizada por vasoconstrição, mucosas hipocoradas, tempo de preenchimento capilar prolongado e déficit de pulso, e é a mais frequentemente observada nos felinos em sepse (4). Os gatos também apresentam resposta clínica peculiar ao choque séptico, apresentando hipotensão, bradicardia e hipotermia, sinais que caracterizam a “tríade da morte dos felinos” (11).

A bradicardia ocorre porque, na maioria das espécies, a queda no débito cardíaco é compensada pela taquicardia pela ativação simpática, via barorreceptores; nos felinos, no entanto, quando os barorreceptores detectam estiramento arterial inadequados, tanto as fibras vagais como as simpáticas são estimuladas simultaneamente. Uma vez que o débito cardíaco depende de fatores como frequência cardíaca e contratilidade, o mecanismo compensatório do choque é bloqueado. Felinos hipotérmicos, com a temperatura retal abaixo de 34°C, possuem o centro termorregulatório ineficiente, e desta forma, os mecanismos para geração de calor não ocorrem, a exemplo da vasoconstrição periférica, que é substituída pela vasodilatação, o

que implica na contínua “perda” de calor. A taxa metabólica reduzida, leva ao comprometimento ainda maior da produção de calor pelos mecanismos endógenos celulares. A hipotermia grave também deprime o SNC, de forma que o hipotálamo fica insensível à queda da temperatura. Quando esta fica abaixo de 31°C, a termorregulação é completamente afetada. A acidose metabólica decorrente da hipotermia interfere na função miocárdica. Em felinos hipotérmicos, a reação adrenérgica é insuficiente, pois ocorre redução da resposta dos receptores alfa 1 devido às mudanças em sua conformação a baixas temperaturas. A liberação de catecolaminas é, então, reduzida, comprometendo assim a contratilidade, além de acarretar vasodilatação. A vasodilatação associada à bradicardia resultará em hipotensão, que por sua vez agravará ainda mais a bradicardia e a hipotermia (31).

Além das manifestações clínicas, o diagnóstico de sepse ou sepse grave também pode ser realizado por meio de análises hematológicas e mensuração da concentração sérica de endotoxinas. Quanto às alterações laboratoriais esperadas em felinos com sepse, a anemia é um achado comum relacionado às doenças inflamatórias nesta espécie. A icterícia pode ocorrer e provavelmente se deve à hemólise (4). Também se verifica neutrofilia, eosinopenia, hiponatremia, hipocloremia, hipocalcemia e hiperbilirrubinemia (1). A hipoalbuminemia ocorre devido à permeabilidade vascular e à mudança nas vias de síntese hepática, em função das proteínas de fase aguda (4). Leucocitose com desvio a esquerda e alterações de coagulação, como elevação no tempo de protrombina, também são alterações previstas nos felinos em sepse. Dosagens plasmáticas de TNF, IL-10, IL-6 e CXCL-8 podem ser utilizadas para o diagnóstico da sepse em gatos, além de possuírem valor prognóstico nesta espécie (25).

Para o tratamento da sepse em felinos, deve-se considerar a “terapia guiada por metas” (*goal-directed-therapy*), que envolve o manejo e monitoramento intensivo da hemodinâmica em pacientes de alto risco (32). Os gatos que permanecem hipotensos mesmo após reposição volêmica e estabilização da temperatura, podem necessitar de administração de catecolaminas exógenas. O fármaco de primeira escolha neste caso é a dopamina (2,5 a 15 µg/kg/min, IV). A dobutamina também exerce efeito inotrópico e cronotrópico positivo, melhora o débito cardíaco e a oferta de oxigênio, porém, felinos mantidos em infusão contínua (2 a 20 µg/kg/min, IV) com este vasopressor por mais de 24 horas, devem ser monitorados de perto devido ao risco de convulsões. Naqueles arresponsivos à terapia com dopamina ou dobutamina, noradrenalina (0,1 a 3 µg/kg/min, IV) deve ser considerada (3). Em humanos, recomenda-se o uso da vasopressina (0,03 unidades/min). Indica-se também a utilização da hidrocortisona no choque séptico quando há hipotensão refratária à reposição de fluido e a vasopressores. A dose máxima recomendada é de 300 mg/dia (33).

A suplementação de oxigênio em felinos pode ser feita por meio de gaiolas ou máscaras (3) (Figura 1), porém, em casos severos, faz-se necessário a ventilação com pressão positiva (Figura 2).



Figura 1. Felino, SRD, 10 anos, em choque séptico recebendo oxigenoterapia com auxílio de máscara.



Figura 2. Felino, SRD, 10 anos, em choque séptico recebendo oxigenoterapia com auxílio de ambú.

Nestes casos, a intervenção precoce é o ideal, evitando assim, que o animal fique agônico. Felinos em sepse podem desenvolver edema pulmonar e efusão pleural, e a auscultação crepitante só é percebida quando o edema é grave (34).

Felinos em sepse podem apresentar coagulopatia. A transfusão sanguínea promove melhor oxigenação dos tecidos, além de repor fatores de coagulação e fornecer suporte coloidal, devendo ser considerada nesta espécie quando houver sinais de hipóxia e hematócrito $<20\%$. A administração de plasma é indicada em gatos com tempo de coagulação aumentado (3). As particularidades da espécie felina devem ser sempre lembradas ao instituir a terapia transfusional, visto o risco de reações potencialmente fatais em gatos, mesmo durante a primeira transfusão (35).

Um componente crítico da terapia do paciente felino séptico é a eliminação do foco infeccioso. A administração intravenosa de antibióticos de amplo espectro é indicada até a obtenção dos resultados da cultura e antibiograma (3). Em medicina veterinária são comuns as associações entre enrofloxacina e ampicilina, ou o uso de cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração. Metronidazol ou clindamicina podem ser adicionados para o espectro anaeróbico (32). Deve-se atentar para a administração parenteral de enrofloxacina, pois em felinos, este antibiótico pode causar degeneração da retina, levando à cegueira (36).

SEPSE: O QUE HÁ DE NOVO?

As diretrizes para a sepse e choque séptico, publicadas em 2008 (“*Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock*”), foram revisadas recentemente pelo Instituto Latino Americano da Sepse, mantendo-se o sistema “GRADE” para graduação da qualidade da evidência e poder da recomendação. Este sistema classifica as recomendações terapêuticas em “forte”, aplicadas à maioria dos pacientes, e “fraca”, as quais devem ser sugeridas considerando-se circunstâncias individuais dos pacientes (Campanha Sobrevivendo a Sepse, diretrizes atualizadas, Instituto Latino Americano da Sepse) (37).

Desta forma, em medicina, segundo o Instituto Latino Americano da Sepse, as recomendações terapêuticas fortes atuais são: mensuração do lactato, realização de culturas, antibioticoterapia intravenosa, controle do foco infeccioso e reanimação inicial, por meio da reposição volêmica e drogas vasoativas. Todas estas medidas devem ser tomadas nas primeiras 6 horas após o diagnóstico de sepse, baseando-se na terapia guiada por metas (37).

Especialmente quanto à reposição volêmica, recomenda-se o uso de cristalóides e coloides, naturais ou artificiais, não havendo evidência favorável a um tipo específico de fluido, inclusive a terapia vasopressora pode ser indicada para manter a perfusão nos casos de hipotensão grave, mesmo no decorrer da ressuscitação volêmica. Os vasopressores de primeira escolha no choque séptico são a norepinefrina ou dopamina, e esta não deve ser utilizada em dose baixa objetivando-se efeito renoprotetor (37).

O manejo do paciente em sepse no período de manutenção, isto é, das 6 às 24 horas pós-diagnóstico, compreende insulinoterapia para o controle de hiperglicemia em pacientes com sepse grave/choque séptico (recomendação forte), estratégia de ventilação mecânica com volume corrente limitado para pacientes com LPA (lesão pulmonar aguda)/SDRS (síndrome do desconforto respiratório sistêmico) (recomendação forte) e o uso de baixa dosagem de corticoide (recomendação fraca) (37).

Em estudos realizados com felinos sépticos não observou-se insuficiência adrenal relativa, ou seja, CIRCI, portanto, atualmente em medicina veterinária, não há recomendação para o emprego de corticoterapia em pacientes com choque séptico (38).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sepse ainda é a maior causa de morte em unidades de terapia intensiva humanas. Em medicina veterinária, também se verificam altos índices de morbimortalidade, no entanto, poucos estudos se dedicam à sua compreensão em animais. A extrapolação dos dados obtidos da medicina muitas vezes não condiz com a realidade dos pacientes veterinários de diferentes espécies, dentre elas, a felina.

Os gatos possuem particularidades anatomofisiológicas que lhes conferem resposta clínica singular à sepse, apresentando-se frequentemente em estado hipodinâmico, caracterizado principalmente por bradicardia, hipotermia e hipotensão, ao contrário dos caninos, e inclusive, dos humanos, os quais manifestam febre, taquicardia, mucosas congestionadas e rápido tempo de preenchimento capilar, sinais da fase clássica hiperdinâmica da sepse. O diagnóstico da sepse em felinos pode ser desafiador e exige do clínico veterinário o conhecimento a cerca desta síndrome e seus respectivos efeitos nesta espécie. O reconhecimento precoce da sepse possibilita a instituição prévia de antibióticos e cuidados intensivos para a manutenção da perfusão, o que tem sido apontado como componente crítico da terapia.

Espera-se que maiores estudos sobre sepse sejam realizados, inclusive na espécie felina, a fim de se compreender mais claramente os mecanismos desta complexa síndrome e reduzir seus índices de mortalidade.

REFERÊNCIAS

1. Declue AE, Williams KJ, Sharp C, Haak C, Lechner E, Reinero CR. Systemic response to low-dose endotoxin infusion in cats. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;132:167-74.
2. Declue AE, Delgado C, Chang C, Sharp CR. Clinical and immunologic assessment of sepsis and the systemic inflammatory response syndrome in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2011;7:890-7.
3. Otto CM. A fresh look at identifying sepsis in cats [Internet]. 2012 [cited 2012 Jul 09]. Available from:
<http://veterinarymedicine.dvm360/vetmed/ArticlesStandard/Article/detail/685811>
4. Brady CA, Otto CM, Van Winkle TJ, King LG. Severe sepsis in cats: 29 cases (1986–1998). *J Am Vet Med Assoc.* 2000;4:531-5.
5. Rabelo RC. Fluidoterapia no paciente felino grave. Anais do 29º Congresso Brasileiro da Anclivepa; Maceió. Maceió: Anclivepa; 2008. p.1-4.
6. Salles MJC, Sprovieri SRS, Bedrikow R, Pereira AC, Cardenuto PRC, Azevedo TM, et al. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepse - revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. *Rev Assoc Med Bras.* 1999;1:86-92.
7. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest.* 1992;6:1642-55.
8. Silverstein D. SRIS, MODS, and sepsis in small animals [Internet]. Rimini; 2006 [cited 2006 Jul 09]. Available from:
http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2006/silverstein2_en.pdf?LA=1
9. Rabello LSCF, Rosolem MM, Leal JV, Soares M, Lisboa T, Salluh JIF. Entendendo o conceito PIRO: da teoria à prática clínica – Parte 1. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2009;21:425-31.
10. Moura HV, Pomerantzeff PMA, Gomes WJ. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2001;4:376-87.
11. Redaell R. Choque em felinos [trabalho de conclusão de curso]. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
12. Henkin CS, Coelho JC, Paganella MC, Siqueira RM, Dias FS. Sepse: uma visão atual. *Sci Med.* 2009;3:135-45.
13. Hospital Universidade de Coimbra. Manual do grupo sépsis. 2ª ed. Coimbra: HUC; 2011.
14. Snowden C, Kirkman E. The pathophysiology of sepsis. *Br J Anaesth.* 2002;1:11-4.

15. El-Achkar T, Huang X, Plotkin Z, Sandoval RM, Rhodes GJ, Dagher P. Sepsis induces changes in the expression and distribution of Toll-like receptor 4 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;5:1034-43.
16. Benjamin CF. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. *Medicina Ribeirão Preto*. 2001;1:18-26.
17. Ramnath RD, Weing S, He M, Sun J, Zhang H, Bawa MS, et al. Inflammatory mediators in sepsis: Cytokines, chemokines, adhesion molecules and gases. *J Organ Dysfunct*. 2006;2:80-92.
18. Knobel E. Óxido nítrico e sepse. *Arq Bras Cardiol*. 1996;4:263-6.
19. Fracasso JF. Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. *Rev Cienc Farm Basica Apl*. 2008;2:119-27.
20. Paixão N. Sepse e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS). In: Rabelo RC, Crowe Junior DT. *Fundamentos de terapia intensiva veterinária em pequenos animais: condutas no paciente crítico*. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda; 2005. p.113-26.
21. Hopper K, Bateman S. An updated view of hemostasis: mechanisms of hemostatic dysfunction associated with sepsis. *J Vet Emerg Crit Care*. 2005;2:83-91.
22. Hackner SG. Disseminated intravascular coagulation: an update for the clinician [Internet]. 2012 [cited 2012 Jul 09]. Available from: <http://www.cuvs.org/pdf/article-disseminated-intravascular-coagulation.pdf>
23. Estrin MA, Wehausen CE, Lessen CR, Lee JA. disseminated intravascular coagulation in cats. *J Vet Intern Med*. 2006;6:1334-9.
24. Griffiths B, Anderson ID. Sepsis, SRIS and MODS. *Surgery*. 2009;10:446-9.
25. Durkan S, Laforcade A, Rozanski E, Rush J. Suspected relative adrenal insufficiency in a critically ill cat. *J Vet Emerg Crit Care*. 2007;2:197-201.
26. Martin LG. Critical illness-related corticosteroid insufficiency in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2011;4:197-201.
27. Mizock BA. Alterations in fuel metabolism in critical illness: hyperglycaemia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2001;4:533-51.
28. Josien A. Etablissement de valeurs usuelles de lactatemie chez le chat [these]. Toulouse: Unisersité de Toulouse, École Nationale Vétérinaire; 2006.
29. Declue AE, Cohn LA. Acute respiratory distress syndrome in dogs and cats: a review of clinical findings and pathophysiology. *J Vet Emerg Crit Care*. 2007;4:340-7.
30. Pereira Júnior GA, Marson F, Abeid M, Ostini FM, Souza SH, Basile-Filho A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. *Medicina Ribeirão Preto*. 1998;31:349-62.

31. Kirby R. Feline shock and resuscitation [Internet]. In: Proceedings of the 30° World Small Animal Veterinary Association Congress; 2005, Cidade do México. Cidade do México: WSAVA; 2005 [cited 2014 Jul 11]. Available from: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2005&PID=10945&O=Generic>
32. Butler AL. Goal-directed therapy in small animal critical illness. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011;41:817-38.
33. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med.* 2008;1:296-327.
34. Kirby R. The cat is not a small dog in ICU: parts I and II [Internet]. In: Proceedings of the 29° World Small Animal Veterinary Association Congress; 2004, Grecia. Grecia: WSAVA; 2004 [cited 2014 Jul 11]. Available from: www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2004&PID=pr008592&Print=1&OGeneric
35. Pimenta MM, Lanini LM, Rabelo RC. Terapia transfusional em felinos. *J Latinoam Med Vet Emerg Cuid Intensivo.* 2010;4:424-50.
36. Gelatt KN, Van Der Woerd A, Ketring KL, Andrew SE, Brooks DE, Biros DJ, et al. Enrofloxacin-associated retinal degeneration in cats. *Vet Ophthalmol.* 2001;4:99-106.
37. Instituto Latino Americano da Sepse. Campanha “Sobrevivendo à sepse” [Internet]. 2010 [acesso 2012 Jul 09]. Disponível em: <http://www.sepsisnet.org>
38. Cooke K. Sepsis: cats always have to be different [Internet]. In: Annual of the 83^a Conference Florida Veterinary Medical Association; 2012, Florida. Florida: FVMA; 2012 [cited 2014 Jul 11]. Available from: http://www.fvmace.org/FVMA_83rd_Annual_Conference/Proceedings/Sepsis.html

Recebido em: 28/09/2012

Aceito em: 07/04/2014

DESMOTOMIA DO ACESSÓRIO DO TENDÃO FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL NO TRATAMENTO DAS TENDINITES RECIDIVANTES EM EQUINOS: RELATO DE TRÊS CASOS

Pierre Barnabé Escodro¹
Carlos Alberto Hussni²

RESUMO

Três equinos adultos atletas, dois na prática de pólo e um trotador, apresentaram tendinite crônica recidivante do flexor digital superficial confirmado por exames físicos e ultrassonográficos, com acometimento das regiões 1A a 2A. Na fase inicial foram tratados com anti-inflamatórios sistêmicos, crioterapia e outros procedimentos conservativos. Apresentando a recidiva e cronicidade do processo, estes foram submetidos à desmotomia do ligamento acessório do TFDS. Quatro dias após a cirurgia iniciou-se o exercício controlado, crioterapia e pomadas antiflogísticas. Após 120 dias os animais foram reavaliados e considerados aptos a exercício inicial em treinamento para esporte. Vinte e quatro meses após a reintrodução ao exercício os três animais desempenhavam atividades esportivas, demonstrando a possibilidade terapêutica da tendinite crônica pela desmotomia acessória do flexor digital superficial.

Palavras-chave: equino, tendinite, tendão flexor digital superficial, ligamento acessório, desmotomia

SUPERIOR CHECK LIGAMENT DESMOTOMY FOR TREATMENT OF RECURRENCE OF SUPERFICIAL DIGITAL FLEXOR TENDONITIS IN HORSES: THREE CASES REPORT

ABSTRACT

Three adult equine athletes, two Thoroughbred in practice of polo and a Standadbred had recurrence of superficial digital flexor tendonitis confirmed by physical examination and ultrasound, with involvement of the regions 1A to 2A. In the initial phase were treated with anti-inflammatory systemic, cryotherapy and other conservative therapeutics procedures. By presenting the recurrence and chronicity of the process, these were submitted to superior check desmotomy. Four days after the surgery was started the controlled exercises, cryotherapy and heparinoid ointment. After 120 days the animals were reevaluated and deemed suitable subjected to initial exercise in training for sport. Twenty-four months after reintroduction to exercise the three animals performing sports activities, demonstrating the therapeutic potential of chronic tendonitis by superior check desmotomy.

Keywords: horse, tendonitis, superficial digital flexor tendon, superior check ligament, desmotomy

¹ Professor Adjunto das Disciplinas de Clínica Médica de Equídeos, Técnica e Clínica Cirúrgica Veterinária do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Líder no CNPq do Grupo de Pesquisa e Extensão em Equídeos da UFAL.

² Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP). Distrito de Rubião Júnior, S/N - CEP: 18.618-000. Botucatu-SP

DESMOTOMÍA DEL LIGAMENTO ACCESÓRIO DEL TENDÓN FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL COMO TRATAMIENTO DE RECURRENCIA DE LAS TENDINITIS EN EQUINOS: REPORTE DE TRES CASOS

RESUMEN

Tres caballos adultos, dos en la práctica del polo y un trotador, con recurrencia de tendinitis del flexor digital superficial confirmado mediante el examen físico y ultrasonido, con participación de las regiones 1A a 2A. En la fase inicial fueron tratados con anti-inflamatorio sistémico, la crioterapia y otros procedimientos conservativos. Mediante la presentación de la recurrencia y cronicidad del proceso, se sometieron a desmotomía del ligamento accesório del tendón flexor digital superficial. Cuatro días después de la cirugía fue iniciado el ejercicio controlado, la crioterapia y abrillantadores antiflogísticas. Después de 120 días los animales fueron reevaluados y considerados adecuados para el ejercicio inicial en la formación para el deporte. Veinticuatro meses después de reintroducción del ejercicio los tres caballos ejecutan práctica deportiva, lo que demuestra el potencial terapéutico de tendinitis crónica por desmotomía del ligamento accesório del tendón flexor digital superficial.

Palabras clave: caballo, tendinitis, tendón flexor digital superficial, ligamento accesório, desmotomía

INTRODUÇÃO

As tendinites nos equinos são frequentes causas de claudicações e destas a tendinite do TFDS tem maior ocorrência, com alta reincidência (1, 2). A etiopatogenia é multifatorial, podendo o esforço supra-fisiológico causar microlesões que causam rupturas das fibras tendíneas (1, 3, 4). O diagnóstico ultrassonográfico da tendinite do flexor digital superficial para o membro torácico de equinos pode ser classificado em quatro tipos (5) quanto à posição, considerada alta, imediatamente distal ao carpo ou tarso (regiões 1A-1B); média, no terço médio do metacarpo ou metatarso (2A-2B); baixa, no terço distal do metacarpo ou metatarso e na região do ligamento palmar ou plantar (3A-3B) e muito baixa quando o TFDP está afetado distalmente à articulação metacarpo falângica (6, 7). Na cronicidade a tendinite pode evoluir com aderências, formando tecido cicatricial de menor resistência frente ao tecido original e animais acima de dez anos possuem reparação tendínea mais tardia (3, 6, 8). A desmotomia do acessório do tendão flexor digital superficial ou do “Check Superior” (DLA-TFDS) é descrita como procedimento cirúrgico que pode ser utilizado na correção da tendinite crônica (9, 10), porém com resultados controversos (11-13). Gibson, Burbidge e Pfeiffer (11) relatam que a DLA-TFDS não apresenta vantagens significativas em relação ao tratamento conservativo, podendo a alteração anatomo-fisiológica da transecção do ligamento predispor à desmiste do suspensório do boleto (14), já Fulton et al. (12) citam que a DLA-TFDS sugerem melhorar o prognóstico de retorno do equino com tendinite do flexor digital superficial à atividade esportiva.

O presente trabalho objetiva descrever três casos de equinos com tendinite recidiva do flexor digital superficial, submetidos à DLA-TFDS, acompanhando o pós-operatório e retorno à atividade durante 24 meses.



Figura 1. Equino de Pólo. Aspecto macroscópico da tendinite no membro torácico direito.

RELATO DOS CASOS

Relata-se os casos de três equinos portadores de tendinite crônica e recidivante do TFDS, unilateral torácica, sendo dois no membro direito e um no membro esquerdo. Um cavalo e uma égua da raça Puro Sangue Inglês utilizados em pólo e um mestiço *American Trotter*, adultos com mais de dez anos de idade, apresentaram tendinite do TFDS por no mínimo há seis meses, sendo dois dos animais atendidos anteriormente por profissional e de histórico ignorado. Todos os animais receberam tratamento semelhante na fase aguda com anti-inflamatórios não esteróides sistêmicos, antiflogísticos e crioterapia local, descanso estabilado e ligas nos membros. Apresentaram melhora do quadro e retornaram à atividade física, com recidiva do quadro inicial de tendinite do TFDS, confirmado por exames físicos e ultrassonográficos com evidente lesão do tendão e aumento de volume, rubor e dor no terço médio-proximal nas faces palmar e lateral da região metacárpica, apresentando claudicação de grau 3. Ao exame ultra-sonográfico observou-se áreas hipoecóicas e anecóicas na região 1A a 2 A, com desalinhamento das fibras tendíneas e acúmulo de líquido.

Devido o insucesso dos tratamentos conservativos optou-se pela desmotomia acessória do flexor digital superficial, procedida conforme descrito por Auer (15) com o animal sob anestesia geral de rotina, com acesso pela face medial distal do rádio do membro acometido. O pós-operatório transcorreu sem intercorrência, então medicados com penicilina associada e fenilbutazona. Os pontos de pele foram retirados 15 dias após a cirurgia. Quatro dias após a cirurgia iniciaram os exercícios controlados com as caminhadas diárias. Após 120 dias os animais foram reavaliados, com ausência de claudicação, não apresentando sensibilidade à palpação local e ao exame ultrassonográfico constatou-se ausência de líquido e alinhamento satisfatório de fibras tendíneas, retornando às suas atividades. Observados por 24 meses mantiveram-se na atividade esportiva sem recorrência do processo.

É possível concluir que a desmotomia do acessório do tendão flexor digital superficial é uma técnica cirúrgica que pode ser indicada no tratamento da tendinite crônica deste tendão, consideradas as possibilidades de sucesso e de recidivas de acordo com o treinamento dos animais e do interesse na atividade desempenhada, em casos com tentativas de tratamento conservativo anterior sem sucesso.

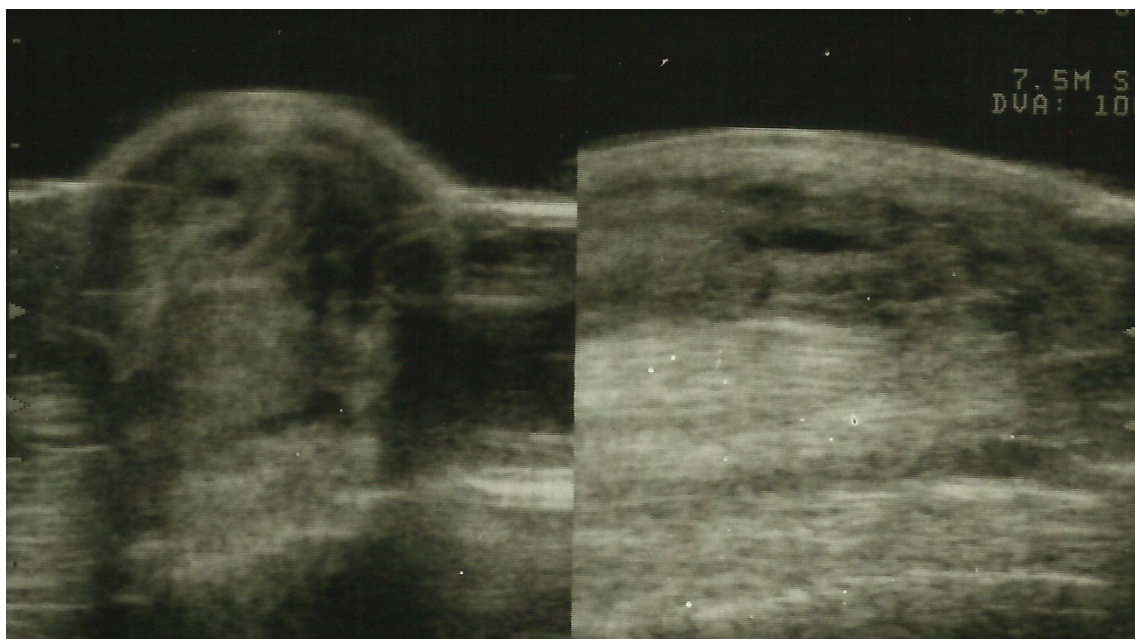


Figura 2. Equino de Pólo, Imagem do exame de ultrassom no momento da indicação da desmotomia do acessório do tendão flexor digital superficial.

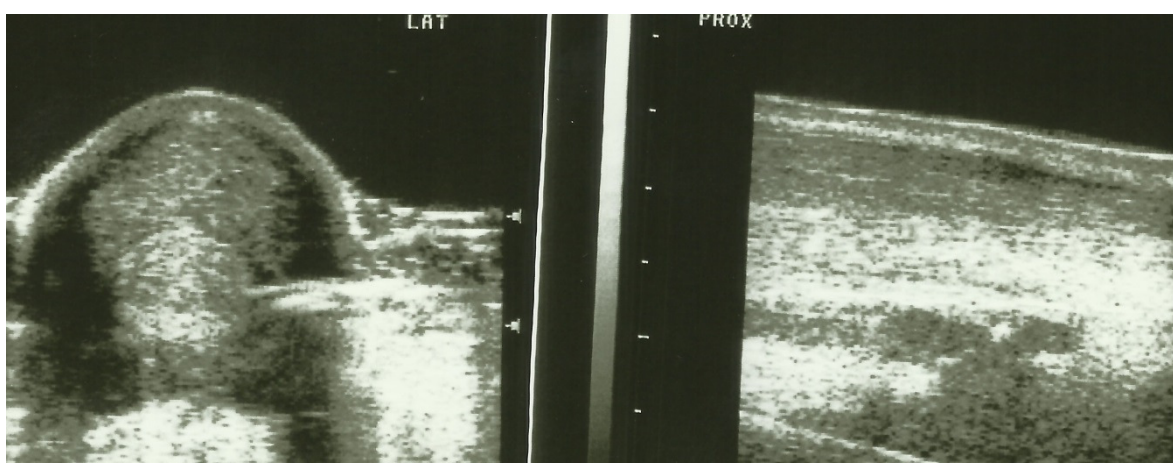


Figura 3. Equino de Pólo, Imagem do exame de ultrassom no momento da indicação da reintrodução ao esporte.

REFERÊNCIAS

1. Ferraro GC, Moraes JRE, Pereira GT, Bueno de Camargo MH, Moraes FR. Estudo morfológico de tendões flexores de equinos. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2003;40:117-25.
2. Dyson SJ. Treatment of superficial digital flexor tendinitis: a comparison of conservative management, sodium hyaluronate and glycosaminoglycan polisulfate. In: *Proceedings of the 43rd AAEP Annual Convention; 1997, Phoenix. Arizona: IVIS; 1997. p.297-300.*
3. Dahlgren LA. Review of treatment option for equine tendon and ligament injuries: what's new and how do they work? In: *Proceedings of the 51st Annual American Association of Equine Practitioners Convention; 2005, Seattle. Seattle, Washington: AAEP; 2005. p.376-82.*

4. Dowling BA, Dart AJ, Hodgson DR, Smith RK. Superficial digital flexor tendinitis in the horse. *Equine Vet J.* 2000;32:369-78.
5. Genovese RL. Diagnostic ultrasonography of equine limbs. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1986;2:145-226.
6. Alves ALG. Avaliação clínica, ultrassonográfica, macroscópica e histológica do ligamento acessório do músculo flexor digital profundo (ligamento carpiano inferior) pós desmotomia experimental em equinos [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 1994.
7. Alves ALG. Ultra-sonografia diagnóstica do sistema locomotor equino. *Rev Educ Contin CRMV-SP.* 1998;1:31-5.
8. Fernandes MAL, Alves GES, Souza JCA. Efeito do ultra-som terapêutico em tendinite experimental de equinos: estudo clínico, ultra-sonográfico e histopatológico de dois protocolos. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2003;55:27-34.
9. Hogan PM, Bramlage LR. Transection of the accessory ligament of the superficial digital flexor tendon for treatment of tendinitis: long term results in 61 Standardbred racehorses (1985–1992). *Equine Vet J.* 1995;27:221-6.
10. Escodro PB, Fontes Neto MC, Faro FAR, Lopes PFR. A desmotomia do ligamento acessório do tendão flexor digital superficial (check superior) como alternativa no tratamento das tendinites recidivas do tendão flexor digital superficial. *Rev Bras Med Equina.* 2009;4:6-12.
11. Gibson KT, Burbidge HM, Pfeiffer DU. Superficial digital flexor tendonitis in Thoroughbred race horses: outcome following non-surgical treatment and superior check desmotomy. *Aust Vet J.* 1997;75:9:631-5.
12. Fulton IC, MacLean AA, O’Rielly JL, Church S. Superior check ligament desmotomy for treatment of superficial digital flexor tendonitis in Thoroughbred and Standardbred horses. *Aust Vet J.* 1994;71:233-5.
13. Hawkins JF, Ross MW. Transection of the accessory ligament of superficial digital flexor muscle for the treatment of superficial digital flexor tendinitis in standardbreds: 40 cases (1988-1992). *J Am Vet Med Assoc.* 1995;206:674-8.
14. Alexander GR, Gibson KT, Day RE, Robertson ID. Effects of superior check desmotomy on flexor tendon and suspensory ligament strain in equine cadaver limbs. *Vet Surg.* 2001;30:522-7.
15. Auer JA. Flexural deformities. In: Auer JA, Stick JA. *Equine surgery.* 2ª ed. Philadelphia: Saunders; 1999. p.752-65.

Recebido em: 05/05/2012

Aceito em: 23/04/2013

ASSOCIAÇÃO ENTRE A IMUNOTERAPIA INTRAVESICAL E QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA NO TRATAMENTO DE CARCINOMA UROTELIAL EM VESÍCULA URINÁRIA DE CÃO

Talita Mariana Morata Raposo¹
Giovanna Rossi Varallo¹
Rosana da Cruz Lino Salvador¹
Erika Maria Terra²
Mirela Tinucci Costa³
Carlos Roberto Daleck⁴
Andrigo Barboza De Nardi⁵

RESUMO

O carcinoma urotelial, embora de ocorrência rara, é a neoplasia mais comum da vesícula urinária de cães. A terapia intravesical com o Bacilo de Calmette-Guérin, BCG é utilizada em carcinomas vesicais humanos com boa resposta, porém é pouco descrita em cães. O presente trabalho relata o caso de uma cadela, sem raça definida, com 10 anos de idade, portadora de carcinoma urotelial em vesícula urinária tratada com associação de quimioterapia antineoplásica, inibidor de COX-2 e BCG intravesical. O uso da imunoterapia proporcionou resultados satisfatórios, pois, enquanto administrado na paciente, interrompeu a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases. Trata-se, portanto, de uma modalidade promissora no controle de neoplasias.

Palavras- chave: BCG, carcinoma urotelial, vesícula urinária, cão

ASSOCIATION BETWEEN INTRAVESICAL IMMUNOTHERAPY AND ANTINEOPLASTIC CHEMOTHERAPY IN TREATMENT OF THE UROTHELIAL CARCINOMA OF THE URINARY BLADDER IN DOG

ABSTRACT

The urothelial carcinoma although rare, is the most common neoplasm of the urinary bladder in dogs. Local therapy with bacillus Calmette-Guérin, BCG, is used in human bladder carcinomas with a good response, but is rarely described in dogs. This work reports a case of a mixed breed bitch, 10 years old, with an urothelial carcinoma treated with antineoplastic chemotherapy, COX-2 inhibitors and intravesical BCG. The use of immunotherapy showed satisfactory results in the patient, then stopped tumor progression and metastasis. It is, therefore, a promising method for the control of neoplasms.

Keywords: BCG, urothelial carcinoma, urinary bladder, dog

¹ Mestranda em Clínica Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP- Univ Estadual Paulista, correspondência.

² Doutoranda em Clínica Veterinária Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP- Univ Estadual Paulista

³ Prof. Ass. Dr Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP- Univ Estadual Paulista

⁴ Prof. Adj. do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP- Univ Estadual Paulista

⁵ Prof. Ass. Dr. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP- Univ Estadual Paulista

ASOCIACIÓN ENTRE INMUNOTERAPIA INTRAVESICAL Y QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA EN TRATAMIENTO DEL CARCINOMA UROTELIAL DE VEJIGA URINARIA EN PERRO

RESUMÉN

El carcinoma urotelial aunque raro, es la neoplasia más frecuente de la vejiga urinaria en los perros. La terapia intravesical con bacilo Calmette-Guerin, BCG, se utiliza en los carcinomas de vejiga humanos, con buenos resultados, pero es algo poco descrito en perros. Este estudio reporta el caso de un perro, mestizo, de 10 años, que sufre de carcinoma urotelial de vejiga urinaria tratada en asociación con la quimioterapia antineoplásica, la COX 2-y BCG. El uso de la inmunoterapia ha generado resultados satisfactorios, ya que, como se administra en el paciente, interrumpe la progresión tumoral y la metástasis. Por lo tanto, es un método promisor para el control de neoplasias.

Palabras clave: BCG, carcinoma urotelial, vejiga urinária, perro

INTRODUÇÃO

As neoplasias primárias do sistema urinário são incomuns em cães. Os tumores vesicais são os mais frequentes e correspondem a cerca de 0,5 a 1% de todos os neoplasmas caninos (1, 2). Dentre estes, os carcinomas de células de transição ou carcinomas uroteliais são as formas malignas mais comumente diagnosticadas (3). Infere-se que a etiologia dos carcinomas uroteliais seja multifatorial e a obesidade, os antiparasitários tópicos, os inseticidas e o tratamento com ciclofosfamida foram identificados como fatores que podem predispor o desenvolvimento desta enfermidade (4, 5). Além disto, fêmeas caninas e pacientes submetidos à esterilização são mais vulneráveis, em virtude do maior tempo de contato dos agentes carcinogênicos presentes na urina com a mucosa vesical, visto que não possuem o comportamento de demarcação territorial (5, 6).

O carcinoma urotelial é caracterizado pela alta capacidade de invasão e pode se desenvolver como uma formação de base ampla com nódulos salientes, como lesões pediculadas, ou como um espessamento difuso da parede vesical (7). Dessa forma, hematúria, polaquiúria e estrangúria são os sinais clínicos mais relatados pelos proprietários (1). Além disso, 50% dos carcinomas vesicais cursam com metástases, notadamente para pulmões, linfonodos regionais, rins, fígado e próstata (7).

O diagnóstico é determinado por exames de imagem (radiografia contrastada, ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética). O lavado vesical (flushing) para avaliação citológica é uma alternativa rápida, de fácil execução e com baixos custos para o diagnóstico de neoplasia (8). Porém, a confirmação é feita pela análise histopatológica de fragmentos da lesão (4).

A terapia varia conforme o tipo, o tamanho e a localização do tumor intravesical (7). O tratamento cirúrgico associado à quimioterapia antineoplásica e ao uso de inibidores de ciclooxigenase-2 (COX-2) é o de eleição (9). Entretanto, a exérese da massa tumoral nem sempre é possível, em virtude da localização anatômica, das dimensões da neoplasia, bem como das dificuldades e complicações inerentes às técnicas reconstrutivas (10). Dessa forma, outras modalidades terapêuticas, como a imunoterapia, auxiliam no controle da progressão da doença.

A imunoterapia com o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) é frequentemente utilizada como tratamento adjuvante de carcinomas uroteliais não invasivos em humanos pela aplicação intravesical e está associada com a ressecção cirúrgica (11). O BCG promove uma resposta inflamatória inespecífica mediada por linfócitos T. A citotoxicidade contra as células

tumorais é oriunda da ação de citocinas, fator de necrose tumoral alfa e pela produção de óxido nítrico no interior da vesícula urinária (7).

Assim, o objetivo deste relato é descrever o uso da imunoterapia com BCG, associada à quimioterapia antineoplásica no tratamento do carcinoma urotelial canino.

RELATO DO CASO

Uma fêmea canina, sem raça definida, com 10 anos e peso de 4,6 kg foi admitida no Hospital Veterinário da UNESP, Campus de Jaboticabal, com histórico de hematúria, polaquiúria e disúria há um mês. Ao exame físico foi constatada presença de dor abdominal em região hipogástrica. Não foram observadas anormalidades nos exames hematológicos e bioquímicos séricos (creatinina e ALT). A urinálise evidenciou hematúria, leucocitúria e bacteriúria. A cultura urinária foi positiva para *Escherichia coli* com sensibilidade à cefalexina e resistente à quinolona ao antibiograma, devido a realização de tratamentos prévios. Desta maneira, a cistite bacteriana foi tratada com cefalexina (30mg/Kg, a cada 12 horas).

Em virtude da queixa e da avaliação clínico-laboratorial, foram realizados exames de imagem como, ultrassom abdominal e radiográfico de tórax. O exame de ultrassonografia evidenciou uma massa nodular de 2,8 cm por 1,6 cm, em região próxima ao trígono vesical. Além disto, foi observada a presença de mucosa vesical espessada sem comprometimento de ureteres e uretra proximal. Na avaliação radiográfica de tórax não foi evidenciado a ocorrência de metástases pulmonares.

A paciente foi submetida à biópsia incisional, pela realização de celiotomia, com laudo histopatológico de carcinoma urotelial. Em virtude da localização da massa, a retirada cirúrgica completa não pode ser realizada e instituiu-se tratamento com quimioterapia intravesical a cada quatro semanas com cisplatina (50 mg/m²). Após a segunda sessão, como não foi observada citorredução e nem melhora dos sinais clínicos, optou-se, pela terapia multimodal, com quimioterapia adjuvante com carboplatina (300mg/m²/IV), a cada 21 dias, BCG intravesical (1 ml) semanalmente e firocoxibe (5 mg/kg/PO) diariamente, seguida de acompanhamento por exame ultrassonográfico e radiográfico de tórax, realizados mensalmente. Com o início deste novo protocolo, observou-se resolução dos sinais clínicos descritos pela proprietária durante a primeira consulta.

O BCG fez parte do protocolo durante seis meses e neste período observou-se estabilização do crescimento do neoplasma. Em virtude da indisponibilidade e dificuldade de aquisição, o fármaco foi excluído do tratamento, e a paciente foi mantida com carboplatina e inibidor de COX-2. Dois meses após a descontinuação do BCG, observou-se aumento do nódulo intravesical, bem como o aparecimento de uma nova massa na porção ventral da vesícula urinária, envolvendo a porção serosa, sem comprometimento da porção muscular, a qual foi removida pela exérese cirúrgica e o diagnóstico histopatológico de carcinoma urotelial. Até o momento da descrição deste relato, a paciente continua em tratamento, totalizando dez meses de sobrevida.

DISCUSSÃO

O carcinoma urotelial é a neoplasia mais comum que acomete a vesícula urinária de cães e apesar do lavado vesical contribuir para diagnóstico deste enfermidade, nem sempre ele é conclusivo, sendo necessário, assim, avaliação histopatológica da lesão (1, 8, 12)

Em virtude do comportamento agressivo do carcinoma urotelial em vesícula urinária, bem como a baixa resposta terapêutica, o prognóstico desta neoplasia é considerado ruim, apresentando resultados melhores quando se associa o tratamento cirúrgico e quimioterápico (7, 13).

A literatura cita o uso da quimioterapia com agente único como a cisplatina, carboplatina, mitoxantrona, actinomicina D ou doxorubicina para o tratamento de carcinoma urotelial (13). Embora a cisplatina intravesical também seja uma opção terapêutica (12), no presente caso não foi observada resposta satisfatória. O protocolo com carboplatina e inibidor de COX-2 é de eleição para o carcinoma urotelial. Assim, é importante averiguar a expressão de COX-2 nos tecidos neoplásicos, porém um estudo não demonstrou correlação com a intensidade de marcação e a taxa de resposta ao uso do piroxicam (14). Neste caso, a imunistoquímica não foi realizada devido ao custo.

Em humanos, a terapia com BCG intravesical em carcinomas de célula de transição *in situ* é bastante utilizada, com média de resolução de 72%. Esta terapia também é indicada em tumores com alto grau de malignidade, pois reduz a taxa de progressão tumoral (7, 11). Em veterinária ainda pouco se sabe sobre a eficácia do uso do BCG, porém a literatura relata resultados promissores (7). No caso descrito, foi notado benefício no controle da progressão tumoral, uma vez que interrompido, houve crescimento do tamanho da neoplasia, porém, sem a ocorrência de sinais clínicos, além do aparecimento de nova massa.

CONCLUSÃO

O uso da imunoterapia no tratamento do carcinoma urotelial canino foi positivo no controle da progressão da neoplasia, contribuindo deste modo, na melhora dos sinais clínicos e para qualidade de vida da paciente. Apesar de ser uma medicação de difícil acesso, mas de fácil uso, sugere-se que outros pacientes com carcinoma urotelial sejam submetidos a este tratamento para obtenção de resultados mais representativos.

REFERÊNCIAS

1. Norris AM, Laing EJ, Valli VE, Withrow SJ, Macy DW, Ogilvie GK, et al. Canine bladder and urethral tumors: a retrospective study of 115 cases (1980–1985). *J Vet Intern Med.* 1992;6:145-53.
2. Inkelmann MA, Kommers GD, Figuera RA, Irigoyen LF, Barros CSL, Silveira IP, et al. Neoplasmas do sistema urinário em 113 cães. *Pesqui Vet Bras.* 2011;31:1102-7.
3. Knapp DW. Tumors of the urinary system. In: Withrow SJ, Vail DM. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology.* 4a ed. Philadelphia: WB Saunders; 2007. p.649-59.
4. Henry CJ. Management of transitional cell carcinoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003;33:597-613.
5. Mutsaers AJ, Widmer WR, Knapp DW. Canine transitional cell carcinoma. *J Vet Intern Med.* 2003;17:136-44.
6. Knapp DW, Glickman NW, Denicola DB, Bonney PL, Lin TL, Glickman LT. Naturally occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A relevant model of human invasive bladder cancer. *Urol Oncol.* 2000;5:47-9.
7. Carvalho MB, Brum AM. Neoplasias do sistema urinário. In: Daleck CR, De Nardi AB, Rodaski S. *Oncologia em cães e gatos.* São Paulo: Roca; 2009. p.386-98.

8. Jancke G, Rosell J, Chebil G, Jahnsen S. Bladder wash cytology at diagnosis of ta-t1 bladder cancer is predictive for recurrence and progression. *Urology*. 2012;80:625-31.
9. Jark PC, Machado LHA, Lourenço MLG, Sakate M. Uso de inibidores de COX-2 no tratamento do carcinoma de células de transição de bexiga em cães: revisão. *Vet Zootec*. 2011;18:523-30.
10. Caswell M. Transitional cell carcinoma of the urinary bladder in a 14-year-old dog. *Can Vet J*. 2011;52:673-5.
11. Askeland EJ, Newton MR, O'Donnell MA, Luo Y. Bladder cancer immunotherapy: BCG and beyond. *Adv Urol*. 2012;2012:1-13.
12. Fernandes SC, Pereira ML, Daleck CR, Carvalho MB, Rodigheri SM, Nardi AB, et al. Intravesical cisplatin in the treatment for transitional cell carcinoma of the bladder trigone in a dog. case report. *Vet Comp Oncol*. 2009;7:80-97.
13. Molnár T, Vajdovich P. Clinical factors determining the efficacy of urinary bladder tumour treatments in dogs: surgery, chemotherapy or both? *Acta Vet Hung*. 2012;60:55-68.
14. Mutsaers AJ, Mohammed DB, Denicola DB, Snyder PW, Glickman PF, Bennett PF, et al. Pretreatment tumor prostaglandin E2 concentration and cyclooxygenase-2 expression are not associated with the response of canine naturally occurring invasive urinary bladder cancer to cyclooxygenase inhibitor therapy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;72:181-6.

Recebido em: 09/10/2012

Aceito em: 08/11/2013

CRANIOTHORACOPAGUS EM SUÍNO: RELATO DE CASO

Teresa de Jesús Oviedo Socarrás¹
Nubia Braga Pereira²
Misael Enrique Oviedo Pastrana³

RESUMO

As malformações ou anomalias congênitas geralmente são raras, no entanto, nos suínos, espécie com um grande número de leitões, ocorre com uma relativa frequência. São exemplos de anomalias congênitas, os gêmeos que se apresentam unidos por uma ou mais parte de seu corpo. No entanto, há poucos relatos de casos na literatura sobre o tema. Assim, o presente relato de caso teve como objetivo descrever uma ocorrência de gêmeos em suínos, que possuía uma cabeça, um tórax, duplicidade completa da região da pélvis, dos membros posteriores e genitais, além de um cordão umbilical compartilhado. Esse caso ocorreu em uma granja em Córdoba na Colômbia, situado em uma região agrícola onde há o uso extensivo de agrotóxicos.

Palavras-chave: duplicação, malformação, suíno

CRANIOTHORACOPAGUS IN SWINE: A CASE REPORT**ABSTRACT**

Malformations or congenital anomalies are generally rare, however, in some species like pigs with a large number of piglets occurs with frequency. Are examples of congenital anomalies, twins that presented fusion in one or more of their bodies parts. However, there are few studies on the topic. Thus, this case report described an occurrence of twins in pigs, which had a head, a thorax, complete duplicity in the region of the pelvis, the limbs and genitals, and shared an umbilical cord. This case occurred in a farm in Cordoba - Colombia, located in an agricultural region where there is extensive use of pesticides.

Keywords: duplication, malformation, pig

CRANIOTHORACOPAGUS EN PORCINO: REPORTE DE UN CASO**RESUMEN**

Las malformaciones congénitas son generalmente raras, sin embargo, en los cerdos, especie con un gran número de lechones se producen con una frecuencia relativa. Son ejemplos de anomalías congénitas, gemelos que se presentan unidos por una o más de su cuerpo. Sin embargo, hay pocos estudios sobre el tema. Por lo tanto, este caso clínico tuvo como objetivo describir la presentación de gemelos en porcinos, los cuales tenían una cabeza, un tórax, duplicación completa de la región de la pelvis, las extremidades posteriores y genitales, así como cordón umbilical compartido. Este caso ocurrió en una granja en Colombia en Córdoba, ubicado en una región agrícola donde se hace uso extensivo de pesticidas.

Palabras clave: duplicación, malformación, cerdo

¹ Departamento de Ciências Pecuárias, Universidad de Córdoba. Contato principal para correspondência.

² Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais.

INTRODUÇÃO

As malformações ou anomalias congênicas geralmente são raras, no entanto em suínos e em outras espécies, com um número grande de filhotes, ocorrem com uma relativa frequência (1). Tais alterações ocorrem devido à alta produtividade das matrizes, ao curto intervalo de tempo entre as gerações, ao aumento do tamanho dos plantéis e ao aumento do número de partições. Tudo isso tem contribuído para que o tema, a princípio sem grande importância, venha ganhando destaque na suinocultura (2). Segundo o mesmo autor as malformações afetam entre 2 a 3% dos leitões.

São exemplos de anomalias congênicas, os gêmeos que se apresentam unidos por uma ou mais partes do corpo. Essas alterações geralmente estão associadas com a placentação monoamniótica e monocoriônica (3) ou seja, surgem da divisão incompleta de só um ovulo fecundado (monozigótica) (4).

Os defeitos presentes em gêmeos unidos podem variar desde pequenas duplicações a quase completa separação. Os gêmeos podem ser classificados de acordo com a localização da fusão. Os gêmeos siameses fundidos nas regiões cefálica, torácica e abdominal superior são comumente denominados cephalothoracopagus enquanto que os gêmeos com fusão na parte inferior do corpo, região lombo-sacra, são denominados parapagus. Quando a região rostral é duplicada são denominados dicephalus. Adicionalmente, quando a fusão ocorre na região craniana denomina-se craniopagus (3). Como há poucos relatos de casos na literatura, o presente estudo teve como objetivo descrever o nascimento de fetos suínos, gêmeos, fundidos, com falhas na separação das regiões cefálica, torácica e abdominal anterior.

RELATO DE CASO

Em uma leitegada de 15 leitões nascidos vivos, cujo peso total dos filhotes foi de 17 quilos, observou-se o nascimento de gêmeos monozigóticos, machos, com malformação congênita associada à falha na separação de estruturas. Os progenitores da leitegada originaram-se do cruzamento entre as raças Duroc x Pietrain (macho) e Landrace x Pietrain (fêmea). A fêmea com idade de três anos e meio e um histórico de cinco partos prévios, não tinha antecedentes desse tipo de alteração nas leitegadas anteriores. A granja desse estudo pertence a um sistema de produção semiextensivo de suínos do Departamento de Córdoba na Colômbia. O manejo sanitário da granja é realizado por meio de vacinação contra a peste suína clássica e pela aplicação periódica de vermífugos.

Verificou-se que os animais apresentavam uma cabeça, um tórax, dois membros anteriores com orientação espacial normal com relação à cabeça. Por outro lado, na região posterior observou-se a duplicidade completa e simétrica da pélvis, dos membros posteriores e genitais, no entanto, o cordão umbilical era compartilhado (Fig. 1).

Adicionalmente, observou-se que a cavidade craniana possuía um formato côncavo nos ossos frontal e parietal (Fig. 2A) e um defeito de continuidade no osso frontal. Isso permitiu a protrusão das meninges (encefalocele - Fig. 2B). A lesão foi observada como uma pequena proeminência de cor vermelho-escuro entre os globos oculares (Fig. 2B). Evidenciou-se a presença de cavidade oral e nasal única, com duplicidade parcial do maxilar inferior e presença de quatro fileiras de dentes inferiores, além de duplicidade total da língua, palatosquise e presença de um tecido fibroso de consistência dura e forma arredondada na parte mais anterior do palato (Fig. 2C).

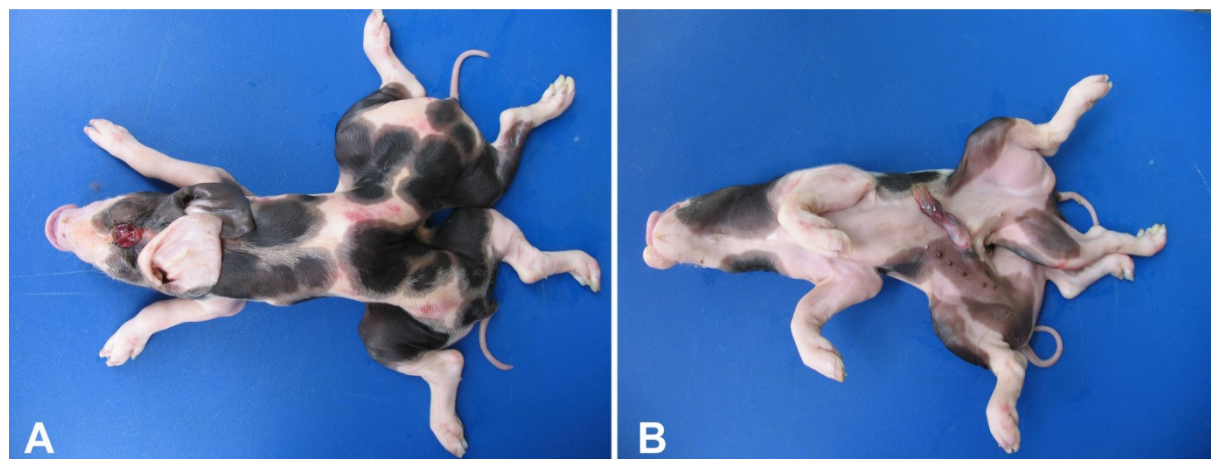


Figura 1. Gêmeos suínos com falha na separação anterior. (A) Vista dorsal onde é possível observar uma cabeça, um tórax e a duplicação da pélvis, dos membros posteriores e da cauda; (B) Vista ventral onde é possível observar além dos achados citados anteriormente, o compartilhamento de um cordão umbilical.

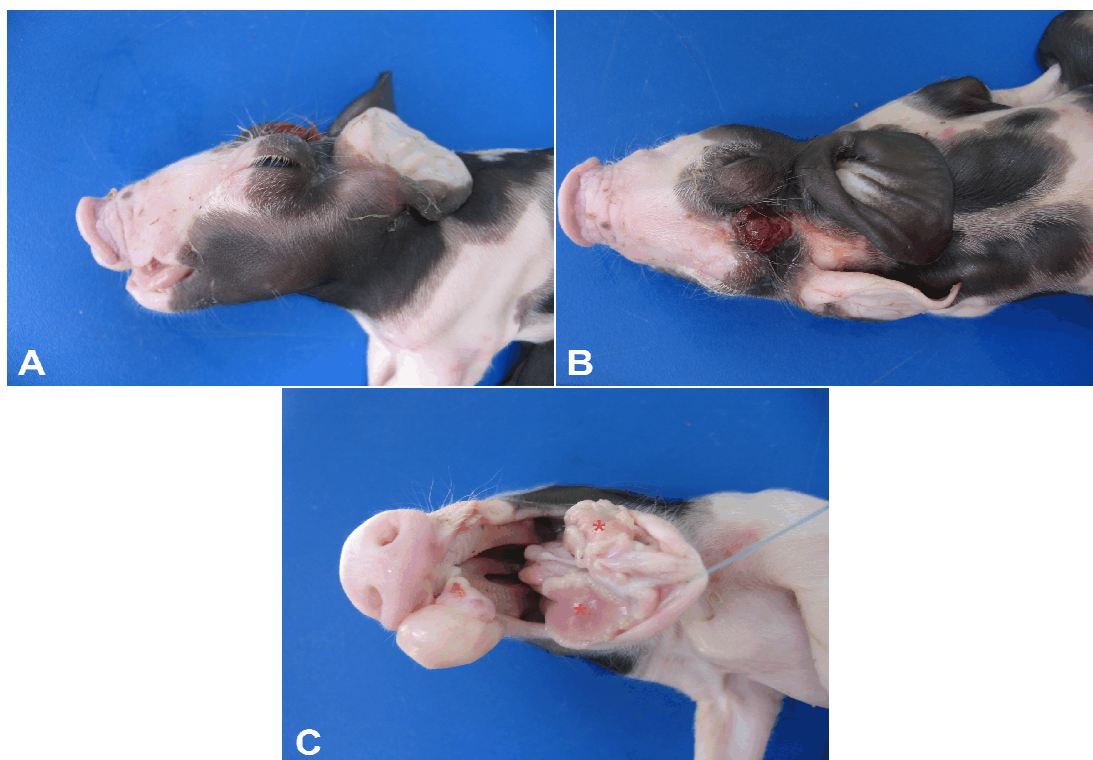


Figura 2. Vista anterior da cabeça do suíno: (A) Vista lateral, observar o aspecto côncavo dos ossos frontal e parietal; (B) Observar a encefalocele; (c) notar os detalhes da palatosquise, duplicação da língua (asterisco vermelho) e duplicação parcial do maxilar.

Pelo exame radiográfico foi possível observar uma abóbada craniana de tamanho reduzido e a duplicidade parcial do maxilar inferior. As sete vértebras cervicais e as dez primeiras torácicas eram únicas, iniciando-se a duplicidade na vértebra T11. As últimas vértebras torácicas, lombares e coccígeas estavam separadas e duplicadas (Fig. 3 A). A necropsia permitiu evidenciar a presença de pulmões, coração, estômago, fígado, baço, intestino delgado, rins compartilhados, intestino grosso e órgãos genitais duplicados (Fig. 3 B).

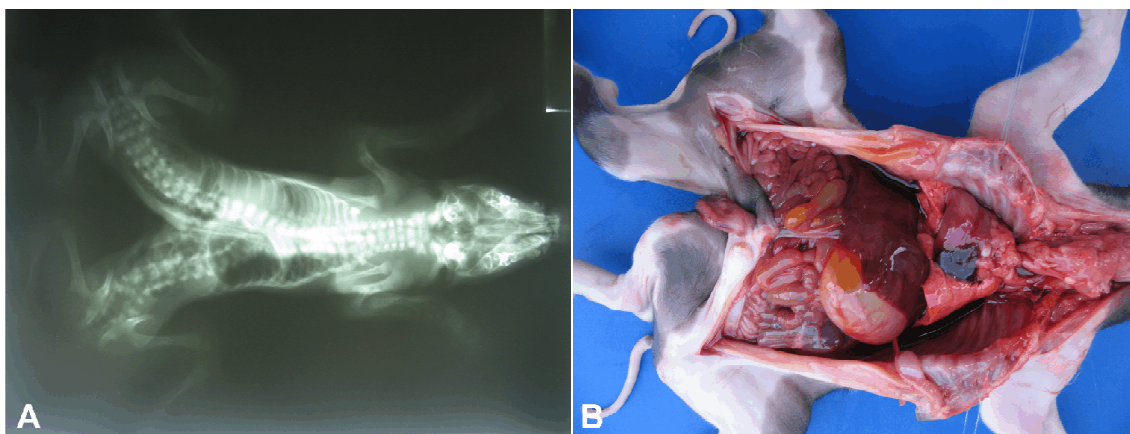


Figura 3. (A) Detalhes radiográficos de gêmeos suínos com falha na separação desde a vertebra T11. (B) Particularidades da necropsia onde se observa o compartilhamento de órgãos vitais como coração, pulmões, fígado e parte do trato gastroentérico.

DISCUSSÃO

Os gêmeos monozigóticos são originados de um único óvulo que é fertilizado e forma um zigoto, que se divide em dois embriões (5). Em raras ocasiões esta divisão ocorre de forma imperfeita, dando origem a gêmeos fundidos (siameses), que derivam de uma separação incompleta do disco embrionário, resultando em dois organismos mais ou menos desenvolvidos, num corpo parcialmente duplicado (6). No presente relato de caso, as características do animal permitiram sua classificação como Craniothoracopagus, sendo que apresentou uma cabeça (Craniopagus ou Monocephalus), um tórax (Thoracopagus), dois membros anteriores (Dibrachius) e duplicidade simétrica de membros posteriores (Tetracelus) (4).

A causa de anomalias congênicas em animais domésticos nem sempre pode ser identificada, no entanto, alguns fatores etiológicos responsáveis por anomalias específicas já foram descritos, entre eles, fatores genéticos (7), agentes infecciosos (8), desequilíbrio nutricional materno (9) dentre outros, porém não se sabe a causa de duplicações congênicas (10).

É importante notar que a região geográfica onde ocorreu o presente caso é agrícola por excelência, com predomínio de grandes plantações de algodão, as quais requerem aplicações sucessivas de agrotóxicos nas lavouras. As aplicações são realizadas por meio de fumigações aéreas, o que facilita a contaminação das fontes de água na região, fato esse que poderia estar relacionado com essa malformação e com outras ocorridas em animais da mesma propriedade, em outras fazendas e afetando espécies diferentes à suína (11). As duplicações congênicas e particularmente os gêmeos fundidos são defeitos relativamente comuns no gado, no entanto a sua incidência é menor nos ovinos, suínos, cães, gatos e cavalos (12). Nos bovinos, a duplicação craniana é predominante, em contraste com a duplicação caudal em ovelhas e suínos (10), tal como a relatada neste caso, que embora se caracterizasse grosseiramente pela duplicidade posterior, teve como característica particular a duplicação de partes anatómicas da cabeça, no caso, duplicação completa da língua e parcial do maxilar inferior.

A divulgação desses dados é importante tanto para os veterinários quanto para os suinocultores, para que os mesmos estejam cientes dessas patologias e relatem outros casos. Muitos suinocultores eliminam os animais com malformações logo após o nascimento, ao invés de doarem para as instituições de ensino. Isso poderia contribuir para uma avaliação mais precisa da incidência de tais anomalias congênicas.

REFERÊNCIAS

1. Prestes FO, Favaretto L, Voitena JN, Pacheco AM, Hamzé AL, Filadelpho AL, et al. Rinocefalia em suínos: relato de caso. *Rev Cient Eletr Med Vet.* 2012;9:18.
2. Sobestiansky J, Barcellos De Mores N, Oliveira S, Carvalho LF, Moreno AM, Roehe PM. Clínica e patologia suína. 2ª ed. Goiania: J Sobestiansky; 2007. p.527-31.
3. Kaufman MH. The embryology of conjoined twins. *Childs Nerv Syst.* 2004;20:508-25.
4. Spiers ZB, Biddle AJ, Gabor MJ, Lee E, Gabor LJ. Monocephalic thoracopagus tetrabrachius in twin lambs. *Can Vet J.* 2010;51:1037-9.
5. Chatterjee A, Morison IM. Monozygotic twins: genes are not the destiny? *Bioinformatics.* 2011;7:369-70.
6. Hovorakova M, Peterkova R, Likovsky Z, Peterka MA. Case of conjoined twin's cephalothoracopagus janiceps disymmetros. *Reprod Toxicol.* 2008;26:178-82.
7. Abbasi AR, Khalaj M, Tsuji T, Tanahara M, Uchida K, Sugimoto Y, et al. A mutation of the WFDC1 gene is responsible for multiple ocular defects in cattle. *Genomics.* 2009;94:55-62.
8. Panter KE, Keeler RF, Buck WB. Induction of cleft palate in newborn, pigs by maternal ingestion of poison hemlock (*Conium maculatum*). *Am J Vet Res.* 1985;46:1368-71.
9. Wrathall AE, Bailey J, Wells DE, Lewis G, James RK, Bainbridge SR, et al. Effects of feeding excess vitamin A to pregnant sows. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1979;26:106-16.
10. Hiraga T, Dennis SM. Congenital duplication. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1993;9:145-61.
11. Oviedo ST, Gonzalez TM, Oviedo PM. Monocephalus dipygus en cachorros: reporte de dos casos. *Rev MVZ Córdoba.* 2008;13:1522-5.
12. Roberts SJ. Gestation period: embryology, fetal membranes and placenta. In: *Veterinary obstetrics and genital diseases (theriogenology)*. 3rd ed. Ann Arbor - MI: Edward Brothers; 1986. p.51.

Recebido em: 03/04/2013**Aceito em: 08/11/2013**

CESAREAN SECTIONS IN MARMOSETS: WHITE-TUFTED MARMOSET (*Callithrix jacchus*)

Nereu Carlos Prestes¹
João Carlos Pinheiro Ferreira¹
Myrna Campos Ferraz¹
Natache Arouca Garofalo²
Carla Regina Barbieri Simões¹
Fabiane Aparecida Sabino¹
Luciana Silva Leal³
Eunice Oba¹

ABSTRACT

Callithrix jacchus is a small primate characteristic to the Brazilian Northeast. We considered relevant to report details on the anesthetic protocol and the surgical technique of cesarean sections applied in three cases of dystocia in *C. jacchus*. Animals were subjected to cesarean intervention because their small body size did not allow for less invasive obstetric maneuvers. The anesthetic protocol was shown to be efficient, safe and original in its equipment adaptations, by means of endotracheal intubation with a 14G catheter. The surgical procedure was relatively simple and did not offer a major challenge in the exposure of the uterus. The suture of the uterus, abdominal wall and skin did not present technical difficulties, however even the thinnest sutures used in dogs and cats may be considered too thick considering the marmosets' small body size.

Keywords: general anesthesia, obstetric intervention, small primate, new world primates, surgical technique

CESAREANA EM SAGUIS: SAGUI-DE-TUFOS-BRANCOS (*Callithrix jacchus*)

RESUMO

Callithrix jacchus é um pequeno primata característico do Nordeste brasileiro. Considerou-se importante a descrição do protocolo anestésico e da técnica cirúrgica da cesariana aplicada em três casos de distocia em *C. jacchus*. Os animais foram submetidos à intervenção cesariana, devido o pequeno tamanho dos seus corpos, o qual não permite manobras obstétricas menos invasivas. O protocolo anestésico mostrou-se eficiente, seguro e original em suas adaptações anestésicas por meio de intubação endotraqueal com um cateter 14G. O procedimento cirúrgico foi relativamente simples e a exposição do útero não foi um grande desafio. Não houveram grandes dificuldades quanto a técnica de sutura do útero, da parede abdominal e da pele, porém os mais finos fios de suturas utilizados em cães e gatos são muito grossos considerando o tamanho do pequeno corpo dos saguis.

Palavras-chave: anestesia geral, intervenção obstétrica, pequenos primatas, primatas do novo mundo, técnica cirúrgica

¹ Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science - FMVZ, UNESP, Botucatu, São Paulo. Contato principal para correspondência

² Department of Surgery and Veterinary Anesthesiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science - FMVZ, UNESP, Botucatu

³ Faculty of Veterinary Medicine - UNIPAR, Umuarama, Paraná

CESÁREA EN TITÍES: TITÍES-DE-MECHONES-BLANCOS (*Callithrix jacchus*)

RESUMEN

Callithrix jacchus es un pequeño primata característico del Nordeste Brasileño. Se considera importante la descripción de un protocolo anestésico y de una técnica quirúrgica de la cesaría aplicada en tres casos de distocia en *C. jacchus*. Los animales fueron sometidos a una intervención por cesárea, debido al pequeño tamaño de sus cuerpos, lo cual, no permitía maniobras obstétricas menos invasivas. El protocolo anestésico se mostro eficiente, seguros y originales en sus adaptaciones anestésicas por medio de la intubación endotraqueal con un catéter 14G. El procedimiento quirúrgico fue relativamente sencillo y la exposición del útero no fue de gran desafío. No presentó dificultades en cuanto la técnica de sutura al útero, pared abdominal y piel, sin embargo, incluso las más finas suturas utilizadas en perros y gatos es muy gruesa considerando el tamaño del pequeño cuerpo de los titíes.

Palabras clave: anestesia general, intervención obstétrica, pequeños primatas, primatas del nuevo mundo, técnica quirúrgica

INTRODUCTION

Callithrix jacchus is a small primate characteristic to the Brazilian Northeast, inhabiting a variety of habitats ranging from coastal Atlantic forest to central caatinga areas (1). Primates in the Callitrichidae family have small body sizes. They are distinguished by their dense hair and ear tufts, which are white in *C. jacchus* (hence “white-tufted marmoset”), and the tail has alternating light and dark rings (2). All callitrichids are omnivorous, feeding on a variety of plant (exudates, seeds, flowers, fruits, nectar, among others) and animal items (arthropods, mollusks and small vertebrates) (3).

Callitrichids have the highest reproductive capacity among non-human primates (4). Females have a highly variable ovulation rate, ranging from one to four follicles per cycle, and as such marmoset litter sizes typically vary in captivity from singletons to quadruplets (5). There are published reports of obstetric problems in *C. jacchus*; in these cases a cesarean intervention is generally advised, however sometimes soft manual traction of the fetus and pharmacological stimulation of uterine contractions may prove useful. Obstetric assistance for primates is rather an exception, due to the low frequency with which these animals are brought to clinical visits and to the relatively uncommon necessity for obstetric interventions (6). We therefore considered it relevant to report details on the anesthetic protocol and the surgical technique of cesarean sections applied in three cases of dystocia in *C. jacchus*. These primates have a characteristic communal breeding strategy, in which the infants remain in the family group until adulthood, and one of the main roles of the non-breeding females is to cooperatively care of the offspring (3, 7).

CASE REPORT

The cases here in reported occurred from July 2010 to December 2011 at the *C. jacchus* captive colony maintained at the Medicine Center and Research on Wild Animal, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (22°53'09"S, 48°26'42"W; mean annual temperature = 22°C). All procedures were approved by the Ethics Committee (N° 126/2010).

Marmosets were housed in 60 x 120 x 60 cm cages, under natural conditions of temperature, humidity and light. Two meals were offered daily: in the morning, fruits, vegetables and eggs; in the afternoon, a mixture of commercial food (Alcon Club Monkey

Cookies®, Alcon Pet), nutritional supplements (Sustagen®, Mead Johnson & Company), banana and honey. Mealworms (*Tenebrio molitor*) were also offered weekly.

To avoid aggressive behaviors, couples were introduced through a slow adaptation process over 11 months, in which they were placed in neighbouring cages but separated by a metal sheet with a thin crevice. Following this gradual olfactory, auditory and visual approximation, mutual aggressive behaviour was monitored and behaviourally compatible pairs were paired. Animals were paired in July 2011 and copulated, thus parturition was expected to occur in December of the same year; video cameras were placed inside the cages to monitor behaviour and allow for early obstetric interventions. Parturient females were brought to the ambulatory, of which three had signs of dystocia:

- Female 1: Abdominal contractions started at 10:30 h, 26/11/2011. Manual traction was successful for the first fetus, and it was decided to wait until the following morning for the natural expulsion of the second fetus, which did not occur and therefore a cesarean section was performed.
- Female 2: Abdominal contractions started at 07:00 h, 13/12/2011. After three hours with no fetuses having been delivered, fetal death was detected and cesarean section was performed at 11:00 h.
- Female 3: Apathy and anorexia were noted on the morning of 21/12/2011, although normal appetite had been observed until the previous day. Obstetric exams detected uterine atony, and cesarean section was conducted on the afternoon of the same day.

Anesthetic protocol and surgical technique

Physical examination and ultrasonography (Chinson 8100VET with 8 Hz probe) revealed fetal relative oversize and fetal death in the three females, thus animals were clipped and prepared for surgery. Animals were placed in an induction chamber (Figure 1A), and anesthesia was induced with 4% isoflurane in 100% oxygen. Following muscular relaxation and decubitus, animals were removed from the chamber and anesthesia was further induced with isoflurane through a facial mask. Once palpebral, interdigital and laryngotracheal reflexes were lost, endotracheal intubation was performed with a 14G catheter; 2% lidocaine (solution 2%) was topically applied to the larynx to facilitate intubation.

Due to the small size of animals, an adapted circuit was confectioned to allow assisted ventilation and to avoid CO₂ re-inhalation. Ventilation was adjusted according to end-tidal CO₂ values obtained by capnograph. If ETCO₂ values rise above physiological values (35-45 mmHg), assisted ventilation was initiated manually. Anesthesia was maintained with isoflurane (0.5 to 2.5%) in 100% oxygen, and additional trans-operative analgesia was provided through morphine or methadone 0.1 mg/kg IM. Fluid therapy (Lactated Ringer's solution) was administered with a syringe infusion pump (Syringe infusion pump ST 680, Samtronic, São Paulo, Brazil) (5 mL/kg/h), and vital parameters were maintained in physiological ranges for the specie and monitored through Doppler vascular (Parks Medical, Oregon, USA), electrocardiography and capnography (Digicare LifeWindow, Florida, USA). Normothermia was maintained through hot air insufflators during the entire procedure.

Following antiseptic procedures (Povidone-iodine + alcohol) (Figure 1B), laparotomy was performed through the incision of the skin, musculature and peritoneum along the linea alba; special care must be taken during the incision of the abdominal wall to avoid the accidental perforation of the bladder, as it will often be full and juxtaposed to the gravid uterus. The uterus was exposed and incised transversally to allow the removal of the dead

fetuses and their respective placentae (Figure 1C). The uterus was sutured with catgut 3-0 in a monolayer Schimieden pattern; the peritoneum and abdominal musculature were sutured with vicryl 2-0 in a simple running pattern; the subcutaneous tissue was approached using vicryl 2-0 in a Cushing pattern, and the skin was closed using mononylon 3-0 in a running suture (Figure 1D). Anesthetic administration was discontinued at the end of the surgical procedure, the endotracheal catheter was removed upon regaining of protective reflexes, and anesthetic recovery was smooth and uneventful in all cases. Meloxicam 0.1mg/kg IM was administered to produce post-operative analgesia only immediately after the cesarean. Tramadol chloridate 1mg/Kg PO TID was used for five days in the post-operative. Antimicrobial therapy was administered by a single dose of benzathine penicillin 20 UI/kg IM, and cephalexin 20 mg/kg PO BID for 5 days (yogurt was used to improve palatability).



Figure-1A. Anesthetic induction Box. B. Endotracheal intubation and abdominal antisepsis. C. Removal of the fetus and placenta. D. Skin simple interrupted and anesthetic recovery.

One of the females (female number 3) died fifteen days after surgery. At the tenth day, evisceration occurred after the removal of the suture from the cesarean intervention, and a new surgical procedure was necessary to seal the abdominal wall; the same anesthetic protocol was used. On the following days, the female presented vomit, anorexia and prostration, while also arching her back and not defecating. Death occurred five days later, and necropsy revealed the digestive tract was filled with food; this reaction may have been caused by the administration of tramadol, a medication offered continuously for five days in the post-operative and that may have caused constipation. The maternal and fetal detail in the studied cases (table 1) are showed below.

Table 1. Maternal and fetal details

Female	Number of fetuses	Maternal mass	Fetus mass	Fetus gender	Fetus body length	Fetus tail length	Fetus skull diameter
1	2	264 g	34.4 g	F	15 cm	10 cm	9 cm
			36.1 g	M	15 cm	10 cm	9 cm
2	2	338 g	34.0 g	F	13 cm	9 cm	9.5 cm
			32.0 g	M	11 cm	10 cm	9 cm
3	2	270 g	28 g	F	11 cm	9 cm	7 cm
			28 g	F	11 cm	8 cm	10 cm

DISCUSSION AND CONCLUSION

Varela, Guilló and Buxó (2) performed a cesarean section in a 1.5 year-old female, weighting 456 g. After 150 days of pregnancy, physical examination revealed the death of the fetuses and radiography indicated fetal absolute oversize. In agreement the cases here presented may be considered exceptions considering both the low frequency with which non-human primates are brought to exotic pet clinics and the relative infrequency with which obstetric interventions are necessary in these species.

Cesarean sections in marmosets are technically simple procedures; the surgical technique described by Varela, Guilló and Buxó (2) was used in the studied cases, however with different sutures. Because the placenta of the callitrichids is hemochorial monodiscoid, the incision to the uterine wall was transversal to avoid risks of hemorrhage. The anesthetic protocol was highly efficient and safe, and it was novel in the anesthetic induction, the intubation technique using an adapted 14G catheter as an endotracheal tube, and the drugs and monitoring procedures, guaranteeing control and patient safety throughout the procedure, unlike the stated by Varela, Guilló and Buxó (2) and Hobson and Hobbs (8).

Although Hobson and Hobbs (8) did not inform the body mass of the *C. jacchus* female they operated, it is possible to affirm that pregnancy duration and fetal mass did not differ considerably from our findings, which were also similar to those of Hobson and Hobbs (8), Varella et al. (2) and Carretero, Guimarães and Sá (9), which differed only in fetal body length.

Animals were subjected to cesarean intervention because their small body size did not allow for less invasive obstetric maneuvers. The anesthetic protocol was shown to be efficient, safe and original in its equipment adaptations.

The surgical procedure is relatively simple and does not offer a major challenge in the exposure of the uterus. The suture of the uterus, abdominal wall and skin did not present technical difficulties, however even the thinnest sutures used in dogs and cats may be considered too thick considering the marmosets' small body size. Smaller and more delicate surgical instruments should be available for use exclusively in this animal species; ophthalmic surgery instruments are more delicate and may be used in these cases.

REFERENCES

1. Stevenson MF, Rylands AB. The marmosets, genus *Callithrix*. In: Mittermeier RA, Coimbra Filho AF, Fonseca GAB, editors. Ecology and behavior of neotropical primates. New York: World Wild Liffe Funde; 1988. p.131-222.
2. Varela F, Guilló A, Buxó A. Cesárea en um mono titi (*Callithrix jacchus jacchus*). Clin Vet Pequeños Anim. 1995;15:210-4.

3. Auricchio P. Primatas do Brasil. São Paulo: Terra Brasilis; 1995.
4. Richter CB. Biology and diseases of Callitrichidae. In: Fox G, Cohen BJ, Loew FM, editors. Laboratory animal medicine. St Diego: Academic Press; 1984. p.353-83.
5. Gilchrist RB, Wicherek M, Heistermann M, Nayudu PL, Hodges JK. Changes in follicle-stimulating hormone and follicle populations during the ovarian cycle of the common marmoset. Biol Reprod. 2001;64:127-35.
6. Napier JR, Napier PH. A handbook of living primates. London: Academic Press; 1967.
7. Abbott DH, Saltzman W, Schultz-Darken N. Reproductive consequences of social subordination in female callitrichid primates. In: Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians; 1996, Puerto Vallarta. Puerto Vallarta: AAZV; 1996. p.194-8.
8. Hobson BM, Hobbs KR. Abnormal fetal development in the marmoset (*Callithrix jacchus*). J Reprod Fertil. 1974;44:323-4.
9. Carretero ME, Gimarães MB, Sá LRM. Parâmetros morfométricos de infantes de saguis-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*) e saguis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) nascidos em cativeiro. In: Anais do 16º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP; 2008, Piracicaba. Piracicaba: SIICUSP; 2008.

Recebido em: 14/02/2013
Aceito em: 28/02/2014

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E MULTIRRESISTÊNCIA BACTERIANA *IN VITRO* DE OTITE EXTERNA DE CÃES – COMUNICAÇÃO CURTA

Leopoldo Augusto Moraes¹
Jessica Marisa Mendes Pereira²
Sandro Patroca Silva²
Vânia Maria Trajano da Silva Moreira³
Alexandre do Rosário Casseb³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi pesquisar os principais agentes bacterianos causadores de otite externa canina e verificar a sensibilidade *in vitro* dos agentes frente a 15 antimicrobianos. Foram coletadas 57 amostras de secreções otológicas provenientes de 39 cães com otite externa, posteriormente semeadas em meio de Ágar sangue de carneiro a 5%, ágar MacConkey, ágar Sabouraud, caldo cérebro-coração e incubados a 37°C para a identificação microbiana, que foi realizada pela morfologia de colônia, coloração pelo método de Gram, produção de pigmento e provas bioquímicas. Foram isolados: *Staphylococcus* spp. (37,8%), *Streptococcus* spp. (12,2%), *Bacillus* spp. (7,32%), *Proteus* spp. (10,98%), *Escherichia coli* (3,66%), *Klebsiella* spp. (1,22%), bacilos Gram negativos não fermentadores: *Pseudomonas aeruginosa* (17,07%) e não identificados (9,76%); leveduras (13,68%): *Candida albicans* (15,38%) e *Malassezia pachydermatis* (84,62%). A susceptibilidade a antimicrobianos foi avaliada com o uso dos seguintes fármacos: gentamicina (68,6%), norfloxacin (61,11%), enrofloxacin (58,33%), amicacina (54,17%), estreptomomicina (48,61%), tetraciclina (29,17%), ciprofloxacina (27,78%), cloranfenicol (25,00%), cefalexina (23,61%), florfenicol (18,06%), ceftriaxona (12,50%), cefalotina (11,11%), sulfonamidas (5,56%), penicilina G (2,78%) e ácido nalidíxico (1,39%). O agente microbiano prevalente foi *Staphylococcus* spp. e as espécies bacterianas causadoras de otite externa nos cães estudados foram multirresistentes.

Palavras-chave: micro-organismos, multirresistência, otite externa, cães

MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS AND BACTERIAL MULTIRESISTANCE *IN VITRO* OF EXTERNAL OTITIS OF DOGS - SHORT COMMUNICATION

ABSTRACT

The aim of this work has been researching the main microbiological agents causing canine otitis externa and evaluate the *in vitro* sensitivity of bacterial agents front 15 antimicrobials. Were investigated 57 samples of ear secretion from 39 dogs. The samples were cultured in 5% sheep blood agar, agar MacConkey, agar Sabouraud, Brain-heart infusion and incubated 37°C. Microbial identification was made through the morphology of the colony, Gram, production of pigment and biochemical evidence. Have been isolated: *Staphylococcus* spp. (37.8%), *Streptococcus* spp. (12.2%), *Bacillus* spp. (7.32%), *Proteus* spp. (10.98%), *Escherichia coli* (3.66%), *Klebsiella* spp. (1.22%), non-fermenting Gram negative bacilli: *Pseudomonas aeruginosa* (17.7%), unidentified (9.76%) and yeasts (13.68%): *Candida albicans* (84 62%) and *Malassezia pachydermatis* (15.38%). Antimicrobial susceptibility was evaluated using the following drugs: gentamicin (68.6%), norfloxacin (61.8%), enrofloxacin

¹ Aluno de Pós-Graduação no Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará,

² Aluno(a) de Pós-Graduação no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

³ Professor do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Pres. Tancredo Neves, s/n°. Bairro: Terra Firme. CEP 66077-530. Belém- (PA).

(58.33%), amikacin (54.5%), streptomycin (48.61%), tetracycline (29.5%), ciprofloxacin (27.78%), chloramphenicol (25.00%), cefalexin (23.61%), florfenicol (6.6%), ceftriaxone (12.50%), cefalotin (11.9%), sulfonamides (5.56%), penicillin G (2.78%) and nalidixic acid (1.39%). The most prevalent microbial agent was *Staphylococcus* spp. and the bacterial species of external otitis in the studied dogs were multidrug resistant.

Keywords: microorganisms, multidrug-resistance, otitis externa, dogs

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO Y RESISTENCIA MULTIDROGA BACTERIANA *IN VITRO* DE LA OTITIS EXTERNA EN PERROS – COMUNICACIÓN CORTA

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue investigar los principales agentes microbianos causantes de otitis externa canina y verificar la sensibilidad *in vitro* de los agentes bacterianos a 15 antimicrobianos. Fueron colectados 57 muestras de secreciones otológicas provenientes de 39 perros con otitis externa, posteriormente sembradas en medio de Agar sangre de carnero a 5%, agar MacConkey, agar Sabouraud, caldo cerebro corazón e incubados a 37°C para identificación microbiana, que fue realizada a través de morfología de colonia, coloración por método de Gram, producción de pigmento y pruebas bioquímicas. Fueron aislados *Staphylococcus* spp. (37,8%), *Streptococcus* spp. (12,2%), *Bacillus* spp. (7,32%), *Proteus* spp. (10,98%), *Escherichia coli* (3,66%), *Klebsiella* spp. (1,22%), bacilos Gram negativos no fermentadores: *Pseudomonas aeruginosa* (17,07%) y no identificados (9,76%); levaduras (13,68%): *Candida albicans* (15,38%) e *Malassezia pachydermatis* (84,62%). La susceptibilidad a los antimicrobianos fue evaluada con el uso de los siguientes fármacos: gentamicina (68,6%), norfloxacin (61,11%), enrofloxacin (58,33%), amikacin (54,17%), estreptomycin (48,61%), tetracycline (29,17%), ciprofloxacin (27,78%), cloranfenicol (25,00%), cefalexin (23,61%), florfenicol (18,06%), ceftriaxone (12,50%), cefalotin (11,11%), sulfonamidas (5,56%), penicilina G (2,78%) y ácido nalidixico (1,39%). El agente microbiano más prevalente fue *Staphylococcus* y las especies bacterianas causadoras de otitis externa en los perros estudiados son multirresistentes.

Palabras clave: microorganismos, multirresistencia, otitis externa, perros

Com a emergência de grande proporção de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos comumente utilizados nos casos de otite externa canina aumenta a necessidade de realização de cultura bacteriana e antibiograma (1, 2). O objetivo deste trabalho foi pesquisar os principais micro-organismos que podem causar otite externa canina, assim como verificar a sensibilidade *in vitro*.

Foram analisadas 57 amostras de secreções otológicas provenientes de 39 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). As amostras foram coletadas assepticamente, de cães que apresentavam sinais clínicos de otite externa, sendo confeccionados esfregaços que foram corados pela técnica de Gram e observados em microscopia comum com objetiva de imersão (1000X). Em seguida foram semeadas em meio de ágar sangue de carneiro a 5%, ágar MacConkey, ágar Sabouraud, caldo cérebro-coração e incubadas a 37°C. As espécies microbianas foram identificadas com base na morfologia de colônia, coloração pelo método de Gram, produção de pigmentos e provas bioquímicas (3).

Para realização dos testes de sensibilidade dos micro-organismos a antimicrobianos (Tabela 1), foi utilizado o método de Bauer et al. (4). Para análise estatística foi utilizado o teste do qui-quadrado (χ^2), admitindo-se para valores menores de cinco a correção de Yates; para ambos os testes preconizou-se nível de significância $\alpha < 0.05$, utilizando o software BioEstat 5.0 (5).

Foram isolados: *Staphylococcus* spp. (37,8%), *Streptococcus* spp. (12,2%), *Bacillus* spp. (7,32%), *Proteus* spp. (10,98%), *Escherichia coli* (3,66%), *Klebsiella* spp. (1,22%), bacilos Gram negativos não fermentadores: *Pseudomonas aeruginosa* (17,07%) e não identificados (9,76%); leveduras (13,68%): *Candida albicans* (15,38%) e *Malassezia pachydermatis* (84,62%).

Com relação ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos houve diferença significativa entre a eficiência dos antimicrobianos para as bactérias Gram positivas ($p < 0.0001$), assim como para o grupo das bactérias Gram negativas ($p < 0.0001$). Outros estudos observaram resistência em pelo menos um antimicrobiano em 55,6% dos casos e multidroga resistência em 35,2% das cepas (6). Comparando a resistência entre os antimicrobianos, o estudo de Cruz, Paes e Siqueira (7), mostrou que tanto para micro-organismos Gram + e Gram – os maiores índices de resistência corresponderam a classe das tetraciclinas, diferente do presente relato onde as bactérias foram sensíveis a tal antimicrobiano.

Observa-se que todas as bactérias isoladas foram multirresistentes, observando-se ainda, duas amostras de *Staphylococcus* spp. que se apresentaram resistentes a todos os antibióticos utilizados (Tabela 1). Esse dado difere do estudo de Cruz, Paes e Siqueira (7) onde tal grupo não apresentou altos índices de multirresistência.

Tabela 1. Isolamento bacteriano e porcentagem de resistência aos antimicrobianos testados.

Antimicrobianos	Gram+ N=47	%	Gram- N=35	%	Total N=82	%
Aminoglicosídeos						
Gentamicina	24	51,06	25	71,43	49	59,76
Amicacina	21	44,68	18	51,43	39	47,56
Estreptomomicina	17	36,17	18	51,43	35	42,68
Quinolonas						
Enrofloxacin	24	51,06	18	51,43	42	51,22
Norfloxacin	21	44,68	23	65,71	44	53,66
Ciprofloxacina	10	21,28	10	28,57	20	24,39
Ácido Nalidíxico	-	-	1	2,86	1	1,22
Sulfas						
Sulfonamida	2	4,26	2	5,71	4	4,88
Cefalosporinas						
Cefalexina*	12	25,53	5	14,29	17	20,73
Ceftriaxona	5	10,64	4	11,43	9	10,98
Cefalotina	4	8,51	4	11,43	8	9,76
Tetraciclinas						
Tetraciclina*	15	31,91	6	17,14	21	25,61
Cloranfenicol						
Cloranfenicol	11	23,40	7	20,00	18	21,95
Florfenicol	5	10,64	8	22,86	13	15,85
Penicilinas						
Penicilina G	2	4,26	-	-	2	2,44
Resistente a todos os antimicrobianos	2	4,26	-	-	2	2,44
Multirresistência**	47	100	35	100	82	100

* $p < 0.0001$ entre Gram positivas e Gram negativas

** Espécies bacterianas resistentes a dois ou mais antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

1. Cole LK, Kwochka KW, Kowalsky JJ, Hillier A. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. *J Am Vet Med Assoc.* 1998;212:534-8.
2. Tuleski GLR. Avaliação da prevalência infecciosa e da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos em otites de cães [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2007.
3. Ikram M. Microbiology. In: Pratt PW. *Laboratory procedures for veterinary technicians.* Missouri: Mosby; 1997. p.119-258.
4. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45:493-6.
5. Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat 5.0-Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília CNPq; 2007.
6. Oliveira LC, Brilhante RSN, Cunha AMS, Carvalho CBM. Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associada. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2006;58:1009-17.
7. Cruz AR, Paes AC, Siqueira AK. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. *Vet Zootec.* 2012;19:601-10.

Recebido em: 06/02/2013

Aceito em: 22/05/2013

DIGESTIBILIDADE *IN SITU* DO SORGO E DESAPARECIMENTO DO NITROGÊNIO AMONIACAL EM VACAS HOLANDEAS ALIMENTADAS COM ZEÓLITA E URÉIA

Felipe Azevedo Ribeiro¹
Jozivaldo Prudêncio Gomes de Moraes¹
Rodrigo Donizeti Cardoso²
Gilberto Batista de Souza³
Sérgio Novita Esteves³
Alberto Carlos de Campos Bernardi³

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a digestibilidade *in situ* da matéria seca do sorgo e o desaparecimento do nitrogênio amoniacal em vacas holandesas fistuladas alimentadas com zeólita e uréia. Foram utilizadas dietas isoprotéicas e isoenergéticas e com zeólita (400g/dia) e sem zeólita. Foram avaliados pH e dinâmica do nitrogênio no rúmen e digestibilidade *in situ*. Os resultados indicaram que a utilização da zeólita natural misturadas à uréia proporcionou a maior disponibilidade de amônio no rúmen. O comportamento do pH ruminal não foi afetado com a inclusão da zeólita estilbita na composição das dietas. A suplementação com zeólita na dieta com uréia levou à menor digestibilidade *in situ* da matéria seca do sorgo (planta) e menor digestibilidade da FDNi.

Palavras-chave: rúmen, digestibilidade, fibra em detergente neutro indigestível, estilbita

IN SITU DIGESTIBILITY OF SORGHUM AND DISAPPEARANCE OF AMMONIA NITROGEN IN HOLSTEIN COWS FED WITH UREA AND ZEOLITE

ABSTRACT

The main objective of this research was to evaluate the *in situ* digestibility of sorghum and the disappearance of ammonia nitrogen in fistulated cows fed with urea and zeolite. Isonitrogenous and isocaloric diets were used with zeolite (400g/day) and without zeolite. Rumen pH, nitrogen dynamics and food digestibility *in situ* were evaluated. The results indicated that the use of natural zeolite mixed with urea increased ammonium availability in the rumen. Rumen pH was not affected by the inclusion of zeolite in the composition of diets. The effect of zeolite supplementation in the diet with urea led to lower *in situ* digestibility of dry matter of sorghum (plant), and iNDF.

Keywords: rúmen, digestibility, indigestible neutral detergent fiber, stilbite

¹ Engenharia Agrônoma, Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Araras, SP, felipegea@hotmail.com

² Engenharia Agrônoma, Unicastelo, Descalvado, SP.

³ Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

LA DIGESTIBILIDAD *IN SITU* DE SORGO Y DESAPARICIÓN DE NITRÓGENO AMONIAL EN VACAS HOLANDEAS ALIMENTADAS CON UREA Y ZEOLITA

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la digestibilidad *in situ* de la materia seca de sorgo y desaparición de nitrógeno amoniacal en vacas Holandesas fistuladas alimentadas con zeolita y urea. Se utilizaron dietas isoproteicas, isocalóricas, con zeolita (400g/day) y sin zeolita. Se evaluó la dinámica de pH y nitrógeno en el rumen y la digestibilidad *in situ*. Los resultados indicaron que el uso de zeolita natural mezclado con urea proporciona la mayor disponibilidad de amonio en el rumen. El pH del rumen no se vio afectado por la inclusión de zeolita estilbita en composición de la dieta. Complementar la dieta con zeolita con urea llevó a disminuir la digestibilidad *in situ* de la materia seca de sorgo (planta) y menor NDFi digestibilidad.

Palabras-clave: digestibilidad ruminal, fibra detergente neutro no digerible, estilbita

INTRODUÇÃO

A toxicidade da uréia está diretamente relacionada com a taxa de degradação ruminal da fonte energética e a rápida degradação da uréia no rúmen. Caso não haja suficiente carboidrato rapidamente fermentescível no rúmen, a uréia transforma-se em amônia numa velocidade maior do que a celulose em ácidos graxos voláteis, necessários para a síntese de proteína microbiana, acarretando um aumento nas concentrações de N amoniacal e uma alta absorção de amônia pela parede ruminal. Isto acarretará uma sobrecarga de N amoniacal no fígado e um gasto maior de energia para a excreção da uréia além de risco de intoxicação (1). Uma alternativa para evitar esse problema é o emprego de complexos de liberação lenta de uréia (1-3), de modo a reduzir a velocidade de fornecimento de amônia no rúmen e aumentar a síntese de proteína microbiana, o consumo de matéria seca e a digestibilidade da fibra, proporcionando maior consumo de energia pelo animal e reduzindo os problemas com toxidez (4, 5).

O produto resultante da mistura de uréia com zeólita pode trazer efeitos positivos na utilização desse suplemento nitrogenado para ruminantes. As zeólitas são aluminossilicatos cristalinos hidratados, que podem reter e liberar facilmente água e cátions, sem modificar sua estrutura (6). As características físicas e químicas das zeólitas naturais conferem a esses minerais várias possibilidades de uso na agricultura (7). O uso desses minerais na dieta (5%) possibilita o aumento da eficiência da conversão alimentar (entre 20% e 30%) e a manutenção dos mesmos ganhos de peso resultantes de dietas sem o mineral, porém com menor quantidade de alimento e de água (6). White e Ohlrogge (8) foram os primeiros a descrever o efeito da retenção dos íons amônio, formados pela decomposição enzimática de compostos nitrogenados não protéicos, na estrutura de zeólitas. Os resultados indicaram, tanto em experimentos *in vitro* como *in vivo*, que mais de 15% do NH_4^+ do rúmen poderia ser retido. Hemken, Harmon e Mann (9) mostraram que a suplementação de 6% de clinoptilolita na ração de vacas leiteiras, que continha uréia, reduziu significativamente a concentração ruminal de NH_3 . No Brasil, Parré (3) testaram a inclusão da zeólita em rações peletizadas com uréia e farelo de algodão, para ovinos, e concluíram que o uso da zeólita, na proporção de 3% da ração, melhorou a retenção de nitrogênio pelos animais.

A presente comunicação traz resultados preliminares de estudo sobre o efeito da suplementação com zeólita (estilbita) e uréia na digestibilidade *in situ* da matéria seca do sorgo e no desaparecimento do N- NH_4 ruminal em dietas de vacas holandesas fistuladas.

O experimento foi realizado na Embrapa Pecuária Sudeste, situada no município de São Carlos, SP. Foram utilizadas duas vacas da raça Holandesa não-lactantes, com 808 e 640 kg de peso vivo, portadoras de fístulas ruminais permanentes. Os animais foram alocados, isoladamente, em dois piquetes de 100 m², com alimentação *ad libitum*, acesso irrestrito à água e sombra natural.

O período experimental total foi de 22 dias sendo que, durante os 17 dias iniciais, os animais foram submetidos à adaptação da dieta. Durante este período, aumentou-se gradativamente a quantidade de uréia fornecida às vacas a fim de se evitar distúrbios metabólicos da seguinte forma: 120 g/dia de uréia do 1º ao 3º dia; 180 g/dia de uréia do 4º ao 6º dia; e 300 g/dia de uréia do 7º ao 22º dia.

As dietas experimentais foram formuladas com planta de sorgo inteira picada, milho em grão moído, sal mineral e uréia. Foram balanceadas para serem isoprotéicas e isoenergéticas com a relação volumoso:concentrado de 80:20 e diferiram apenas na presença ou ausência de 0,4 kg de zeólita. O delineamento experimental utilizado foi quadrado latino 2X2. A zeólita utilizada foi coletada no norte do Estado do Tocantins, no Brasil, na bacia do rio Parnaíba. O mineral era predominantemente do tipo estilbita, e sua caracterização e processamento ocorreu conforme descrito por Bernardi et al. (7).

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, às 8 e às 17 horas, em quantidade suficiente para permitir cerca de 10% de sobras. O volumoso (sorgo) e os concentrados foram pesados separadamente e homogeneizado para cada animal no momento do fornecimento das rações.

No décimo oitavo dia do período experimental foram realizadas coletas de líquido ruminal, nos tempos de 0,33; 0,66; 1; 2; 3; 5; 7 e 9 horas após a alimentação da manhã. Neste dia, depois de alimentadas, as vacas permaneceram alocadas na central de manejo, sem acesso à alimentação e acesso irrestrito à água e sombra. A dieta da tarde foi fornecida somente após o término da última coleta.

Foram coletados aproximadamente 50 mL de líquido ruminal, com uma mangueira de borracha, em três pontos diferentes do rúmen. O pH do líquido ruminal foi imediatamente aferido, após a coleta, com pHmetro portátil. Cerca de 4 mL do líquido foram acondicionados em tubos contendo 1 mL de H₂SO₄ 1N e, imediatamente, congelados, para posterior análise laboratorial. Depois de descongeladas, as amostras foram filtradas e a concentração de N-NH₄ foi obtida pelo método de análise por injeção de fluxo - FIA.

Para estudo da degradabilidade *in situ* da matéria seca, foi utilizada a técnica do saco de náilon em triplicata. Foram pesados 0,5g de sorgo (planta inteira) previamente seco em estufa de ventilação forçada a 60° C por 48 horas e moído em moinho tipo "Willey" provido de peneira com malha de 0,5 mm de diâmetro. As dezoito amostras, para cada animal, após a pesagem, foram então acondicionadas em sacos de náilon, com poros de 50 µm e área de 20 x 40 cm (macro-bag). Os sacos foram selados e amarrados com linha de náilon. As linhas foram protegidas por mangueiras finas de silicone, evitando-se assim que se entrelçassem no interior do rúmen.

As amostras de sorgo, em triplicata, foram introduzidas, ao mesmo tempo, diretamente no rúmen dos animais, pela fístula e retiradas às 12, 7; 24,2; 36,7 46,5; 94,0 horas (ou 760, 1453, 2199, 2788, 4215 e 5640 minutos) após a introdução das mesmas. Depois de retirados, os sacos foram lavados com água, a aproximadamente 50⁰C, e submetidos à secagem em estufa de circulação forçada por 48 horas a 60⁰ C, para posterior pesagem em balança analítica. Após pesados, foram determinados os teores de matéria seca pelo procedimento convencional e FDN (método de Van Soest).

Os resultados de digestibilidade *in situ* da matéria seca (MS), Fibra Detergente Neutro indigestível (FDNi), nitrogênio amoniacal (N-NH₄) e pH foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância. Em seguida, foram ajustadas equações de regressão em função da presença de zeólita e dos períodos de amostragem.

Ribeiro FA. et al. Digestibilidade *in situ* do sorgo e desaparecimento do nitrogênio amoniacal em vacas holandesas alimentadas com zeólita e uréia. Vet. e Zootec. 2014 mar.; 21(1): 102-107.

As equações de regressão dos resultados indicam que o tratamento com zeólita apresentou a maior concentração de N-NH₄ no líquido ruminal no tempo 372,5 minutos (Figura 1 – A). A concentração de íons amônio obtida neste tempo foi de 88,1 mg L⁻¹. Para o tratamento sem zeólita, a menor concentração de N-NH₄ no líquido ruminal foi encontrada no tempo 365,5 minutos e a concentração de íons amônio obtida neste tempo foi de 49,0 mg L⁻¹. A diferença foi altamente significativa ($p < 0,001$) nos valores encontrados nos tratamentos com e sem zeólita. A vaca alimentada sem zeólita apresentou a concentração mínima de N-NH₄ no líquido ruminal, 45% menor do que a vaca alimentada com zeólita.

Pode-se comprovar, nesta situação, o efeito da retenção dos íons amônio, resultado da decomposição enzimática do composto nitrogenado não-protéico (uréia), na estrutura da zeólita estilbita. Os resultados foram análogos aos obtidos por White e Ohlrogge (8), Hemken, Harmon e Mann (9) e Parré (3). Normalmente, a transformação da uréia em nitrogênio amoniacal acontece quase que instantaneamente no rúmen, devido à sua solubilidade e à presença da enzima urease. Neste caso, a zeólita atuou como um complexo dinâmico de retenção liberação de amônio (NH₄⁺), regulando a disponibilidade deste cátion no líquido ruminal. Isso, provavelmente, evitou que o excesso de cátions amônio (NH₄) fosse transformado no gás amônia (NH₃). Este aumento da disponibilidade de amônio (NH₄) no rúmen pode estimular a síntese de proteína microbiana, além de reduzir problemas com toxidez do gás amônia (NH₃).

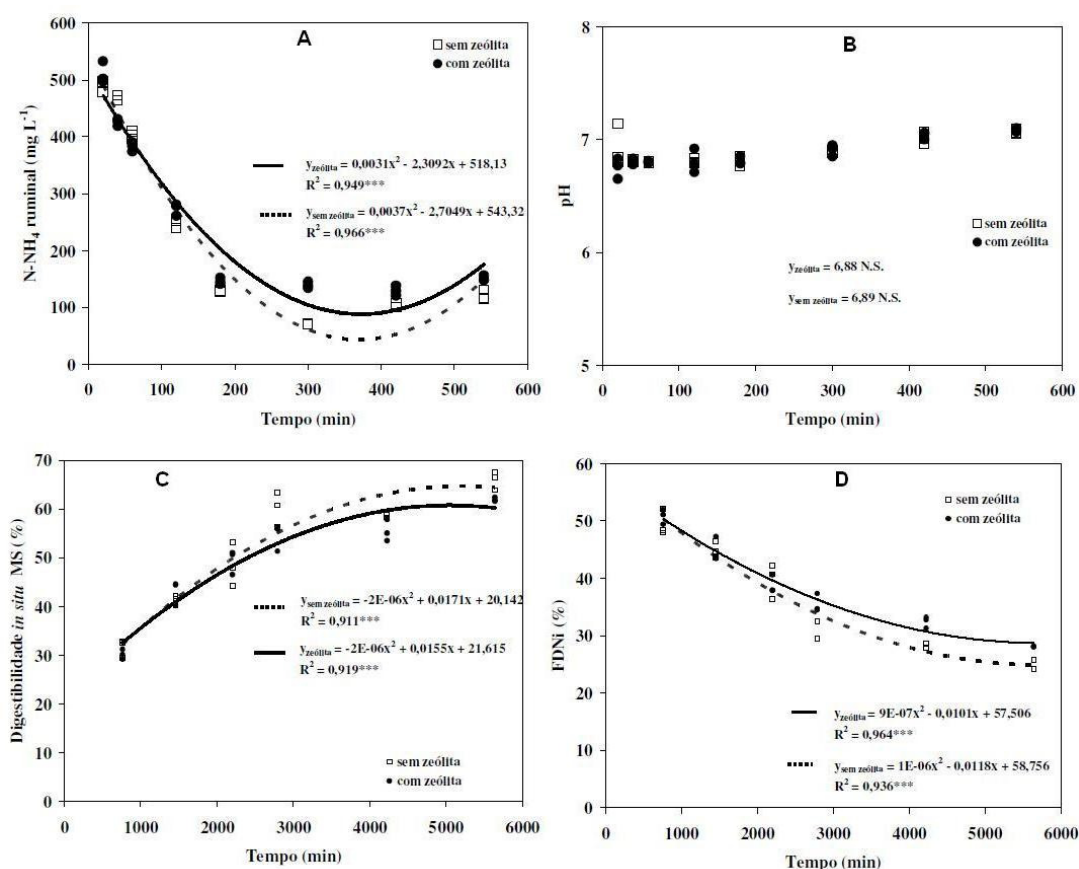


Figura 1. A: Teor (mg L⁻¹) de N-NH₄; B: pH do líquido ruminal; C: Digestibilidade *in situ* da MS do sorgo (planta); D: Fibra Detergente Neutro indigestível (FDNi), em função dos tratamentos (com e sem zeólita na dieta) e nos períodos de amostragem.

Por sua vez, os valores de pH não foram afetados ($p > 0,05$) pelos tratamentos (Figura 1 – B). O tratamento com zeólita apresentou pH médio de 6,88, enquanto o tratamento sem zeólita apresentou média de 6,99. Segundo Erdman (10) são vários os fatores que alteram o

Ribeiro FA. et al. Digestibilidade *in situ* do sorgo e desaparecimento do nitrogênio amoniacal em vacas holandesas alimentadas com zeólita e uréia. Vet. e Zootec. 2014 mar.; 21(1): 102-107.

valor do pH, tais como: produção de ácidos graxos voláteis (AGV), taxa de absorção dos AGV, fluxo de água ruminal, fluxo de saliva, taxa de passagem e acidez do alimento. A alta quantidade de volumosos (80% da ração) fornecidos nas rações pode ter proporcionado secreção salivar suficiente para manter o ambiente ruminal estável, não permitindo detecção de diferenças nos valores de pH.

A digestibilidade *in situ* da matéria seca do sorgo indicou que o uso da zeólita resultou em menor digestibilidade em relação ao tratamento sem zeólita ($p < 0,05$). No tempo 4.275 minutos (71,3 horas), do tratamento sem zeólita, a digestibilidade atingiu o seu valor máximo (56,7%). Já no tratamento com zeólita, a digestibilidade atingiu o valor máximo (51,6%) no tempo 3.875 minutos (64,6 horas). Portanto, o tratamento sem zeólita apresentou digestibilidade 9% maior do que o tratamento com zeólita.

A digestibilidade da Fibra detergente neutro (FDN), Figura 1 – D indica que o tratamento com zeólita resultou na máxima degradação da FDN no tempo 5.611 minutos (93,5 horas), ou seja, FDNi de 29,2%. Para o tratamento sem zeólita, a máxima degradação da FDN foi encontrada no tempo 5640 minutos (94 horas), com FDNi de 24%. Portanto, o tratamento com zeólita resultou em digestibilidade da fibra detergente neutro 18 % menor do que o tratamento sem zeólita ($p < 0,01$).

Assim, conclui-se que a utilização da zeólita natural (estilbita) misturadas à uréia, na alimentação de vacas holandesas, proporcionou a maior disponibilidade de amônio (NH_4^+) no rúmen, reduzindo a possibilidade de intoxicação por amônia (NH_3) uréia nos animais.

O comportamento do pH ruminal não foi afetado com a inclusão da zeólita estilbita na composição das dietas. A grande quantidade de volumoso ofertada nas rações pode ter proporcionado salivagem suficiente para manter o ambiente ruminal tamponado.

O efeito da suplementação com zeólita na ração com uréia levou à menor digestibilidade *in situ* da matéria seca do sorgo (planta) e menor digestibilidade da fibra detergente neutro indigestível.

REFERÊNCIAS

1. Owens FN, Zinn R. Protein metabolism of ruminants. In: Church CD. The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. New Jersey: Waveland Press; 1993. p.564.
2. Cass JL, Richardson CR, Smith KJ. Evaluation of slow ammonia release from urea/calcium compounds. J Anim Sci. 1994;72:243.
3. Parré C. Utilização da uréia e da zeólita na alimentação de ovinos [tese]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 1995.
4. Russell JB, O'Connor JD, Fox DG, Van Soest PJ, Sniffen CJ. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I. Ruminal fermentation. J Anim Sci. 1992;70: 3551-61.
5. Tedeschi LO, Fox DG, Russell JB. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell net carbohydrate and protein system. J Anim Sci. 2000;78:1648-58.
6. Mumpton FA. La roca magica: Uses of natural previous zeolites in agriculture and industry. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96:3463-70.
7. Bernardi ACC, Oliveira PPA, Monte MBM, Souza-Barros F. Brazilian sedimentary zeolite use in agriculture. Micropor Mesopor Mater. 2013;167:16-21.

Ribeiro FA. et al. Digestibilidade *in situ* do sorgo e desaparecimento do nitrogênio amoniacal em vacas holandesas alimentadas com zeólita e uréia. Vet. e Zootec. 2014 mar.; 21(1): 102-107.

8. White JL, Ohlrogge AJ. Ion exchange materials to increase consumption of nonprotein nitrogen in ruminants [Internet]. Canada; 1974 [cited 2010 Jan 16]. Available from: <http://patents.ic.gc.ca/cipo/cpd/en/patent/939186/summary.html>
9. Hemken RW, Harmon RJ, Mann LM. Effect of clinoptilolite on lactating dairy cows fed a diet containing urea as a source of protein. In: Pond WG, Mumpton FA. Zeoagriculture. Use of natural zeolites in agriculture and aquaculture. Boulder: Westview Press Inc.; 1984. p.171-4.
10. Erdman RA. Dietary buffering requirements of the lactating dairy cows: a review. J Dairy Sci. 1988;71:3246-66.

Recebido em: 17/09/2013

Aceito em: 18/03/2014

SISTEMÁTICA DE VIGILÂNCIA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU-SP.

Carla Janeiro Coiro¹
Mariana Vincenzi²
Ana Paula Lopes Corrêa³
Felipe de Freitas Guimarães³
Helio Langoni²

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é considerada uma endemia de controle prioritário no mundo. No Brasil, sua ocorrência vem aumentando devido principalmente, às alterações na estrutura agrária nas últimas décadas, como a migração populacional para os centros urbanos associada a mudanças ambientais. O município de Botucatu situa-se na rota de expansão da doença em território paulista. O presente estudo teve como objetivo desenvolver ações de vigilância para a LVC no município de Botucatu a partir do diagnóstico sorológico, utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e imunoenensaio enzimático (ELISA), em animais atendidos no Ambulatório de Dermatologia da Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, UNESP, Campus de Botucatu. No total, foram examinadas 516 amostras de soro canino com dermatopatias, todas com suspeita clínica de LVC, entretanto, nenhuma destas apresentou positividade.

Palavras-chave: leishmaniose visceral canina, RIFI, ELISA, saúde pública

SYSTEMATIC MONITORING FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN THE CITY OF BOTUCATU/SP.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is considered an endemia of priority control worldwide. In Brazil the incidence of the disease is increasing and expanding quickly due mainly changes in agrarian structure in recent decades, the great population migration to urban centers and also due to environmental changes. Botucatu city lies on the route of spread of the disease in Sao Paulo State. The present study aimed to develop surveillance action for CVL using the indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) and Enzyme Linked immunosorbent Assay (ELISA) in animals attended at the Dermatology Ambulatory of Small Animals at the Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of Botucatu. Were examined 516 canine serum samples from animals with dermatopathies suspected of CVL, however, no sample was positive.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, IFAT, ELISA, public health

¹ Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem. Correspondência. Faculdade de Medicina – UNESP/Botucatu

² Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu

³ Doutorando do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu

EL SEGUIMIENTO SISTEMÁTICO DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA EN BOTUCATU/SP.

RESUMEN

Leishmaniasis visceral canina (LVC) es considerada una prioridad en el control de enfermedades endémicas en todo el mundo. En Brasil, su incidencia está aumentando debido principalmente a los cambios en la estructura agraria en las últimas décadas, como la migración de la población hacia los centros urbanos, y los cambios ambientales. Botucatu se encuentra en la ruta de propagación de la enfermedad en el territorio estatal. Este estudio tuvo como objetivo desarrollar actividades de vigilancia de la leishmaniasis visceral canina en Botucatu mediante ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoensayo enzimático (ELISA) en animales de consulta en el Ambulatorio de Dermatología de la Clínica de Pequeños Animales del Hospital Veterinário de la Facultad de Medicina y Zootecnia de Botucatu, UNESP. Se examinaron 516 muestras de suero canino con enfermedades de piel, animales con sospecha clínica de LVC, sin embargo, ninguna de las muestras fue positiva.

Palabras clave: leishmaniasis visceral canina, IFI, ELISA, la salud pública

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença infecciosa de origem parasitária, causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, transmitida pelo mosquito flebotômico da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Tratava-se de doença de caráter rural e periurbano, mas atualmente se encontra urbanizada, presente em grandes centros urbanos. Essa mudança é perceptível principalmente em áreas de periferia devido ao alto adensamento populacional humano e canino nesses locais (1).

A leishmaniose é considerada uma das seis endemias parasitárias no mundo, encontrando-se distribuída em quatro continentes, entre eles, América Latina, África, Ásia e Europa. Com relação aos casos humanos, 90% ocorrem, principalmente, em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (2). Nas Américas são registrados casos autóctones na Argentina, Bolívia, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Venezuela e Brasil, correspondendo a 90% dos casos que ocorrem no continente americano (3).

A sua importância em saúde pública se deve ao aumento do número de casos e à gravidade da doença. No Brasil já foi registrada em 20 estados, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (4), e os estudos de casos humanos e caninos mostram a urbanização da forma visceral da doença em grandes centros brasileiros (5). Entre os anos de 1984 a 2002, foram notificados ao Ministério da Saúde 48.455 casos da doença humana, sendo que os estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí contribuíram com 66% das notificações (6).

No Estado de São Paulo, a LVC foi diagnosticada em 1998 na cidade de Araçatuba (região nordeste do estado de São Paulo) no serviço de Patologia do Hospital Veterinário da Unesp (7). Neste mesmo ano, foram também detectados cães infectados no Município de Araçatuba (8). Até 2006, em 68 municípios das regiões administrativas de Araçatuba, Bauru, Marília, Presidente Prudente e São João da Boa Vista encontrou-se o vetor *Lutzomyia longipalpis*, e em 45 deles constatou-se a transmissão da enfermidade em cães, e em 34 foram detectados também casos humanos (9). A alta densidade da população canina é um fator de risco para a ocorrência da leishmaniose visceral no homem (10).

A redução dos investimentos em saúde e educação, a descontinuidade das ações de controle, adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo homem além do pouco conhecimento sobre as variantes genéticas, hábitos alimentares e reprodutivos, os fatores

imunossupressores, como a infecção pelo HIV e dificuldade de seu controle em grandes aglomerados urbanos, com problemas de desnutrição, condições precárias de moradia e saneamento básico são fatores que contribuem para a sua ocorrência (11).

A LVC apresenta três ciclos epidemiológicos: silvestre, doméstico e peridoméstico. No doméstico ou peridoméstico, os ambientes envolvidos são o rural, periurbano e/ou urbano. A *Leishmania* circula entre canídeos e gambás, que apesar de terem origem silvestre, estão adaptados ao ambiente rural e urbano (sinantrópicos). O vetor se mantém e consegue reproduzir no entorno domiciliar, transmitindo a enfermidade para o humanos e cães, mantendo a infecção (12).

Os sinais clínicos nos cães são semelhantes aos de humanos como febre e hepatoesplenomegalia. Apresentam ainda lesões de pele como eczema no focinho e orelhas, onicogrífose e linfadenopatia. Nos casos caninos mais avançados, além das alterações de pele ocorrem também uveíte anterior, blefarite, celulite orbital, opacidade de córnea, ceratoconjuntivite seca ou não, conjuntivite, edema das patas e paresia dos membros posteriores, inanição, caquexia e morte. Entretanto, as alterações cutâneas são as manifestações mais comumente observadas na LVC (13). Em alguns animais, a doença pode permanecer latente, com raros casos de cura espontânea, ou ocorrer evolução aguda e grave, com morte em poucas semanas (4).

Na espécie canina, pode haver remissão dos sintomas por longos períodos, com posterior reaparecimento. Mais de 30% dos hospedeiros são assintomáticos, contribuindo para a manutenção da doença no ambiente (4). Os assintomáticos são um grande problema na saúde pública, pois podem não ser detectados para efetivação das medidas de controle.

O diagnóstico laboratorial da infecção canina baseia-se no exame parasitológico direto, na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e no imunoensaio enzimático (ELISA) e nesta espécie devem ser realizados inquéritos sorológicos amostrais a fim de se verificar a prevalência da doença em locais silenciosos ou com focos da doença, e censitários, para áreas com transmissão, como atividade de vigilância, uma vez que animais positivos devem ser eutanasiados, como uma das medidas para o controle da enfermidade (9).

A RIFI é preconizada pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência, juntamente com o ELISA. Resultados falso-negativos podem ocorrer no período de incubação da doença ou em fase inicial de soroconversão (14).

Em Itaipu-RJ, foi encontrada uma prevalência de 11,94% (37/310) para LVC, pela RIFI, em animais sem sinais clínicos da enfermidade (15). A soroprevalência canina no período de 1994 a 1998, em Belo Horizonte - MG foi de 3,6% (16). Esses resultados mostram a importância dos inquéritos soroepidemiológicos para se avaliar o grau de risco da enfermidade no município, e para a população.

Inquérito sorológico e outras atividades de vigilância estabelecidas pela Equipe de Vigilância em Saúde Ambiental do Município de Botucatu, e pelo Hospital Veterinário da FMVZ, com encaminhamento de amostras de soro de cães com dermatopatias para diagnóstico diferencial com pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp., pela RIFI, não revelou positividade, indicando que provavelmente não há autoctonia da LVC no município (1), mas apenas a ocorrência de casos importados ou alóctones, de outras regiões (17).

O controle da leishmaniose visceral recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) desde a década de 70 é baseado em três pontos: diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, eliminação dos cães reservatórios e controle do vetor com aplicação de inseticidas (18). Ao longo dos anos, a aplicação, muitas vezes, parcial destas ações não proporcionou a redução da incidência da LVC (4). O controle do reservatório canino tem sido o tema mais estudado e controverso quanto sua contribuição na redução da incidência da LV humana e canina (19).

A proximidade de Botucatu com regiões endêmicas para LVC como Bauru, Marília, Araçatuba e Tupã, associadas às condições climáticas e fisiográficas propicia a manutenção

da doença. A falta de controle quanto ao trânsito de cães de outras localidades, representam fatores que contribuem para o risco de introdução e disseminação desta zoonose. O controle da LVC deve ser feito de maneira estratégica, identificando-se áreas de risco e, para isso, alternativas como o inquérito sorológico canino, baseado em critérios epidemiológicos, são indicados para o seu combate e vigilância (20). A partir da análise epidemiológica realizada no município e estado, os profissionais de saúde poderão identificar e classificar as diferentes áreas e adotar as recomendações propostas para a vigilância, monitoramento e controle da leishmaniose visceral (4).

Os objetivos do presente estudo foram estabelecer ações de vigilância para LVC em Botucatu/SP capazes de monitorar a ocorrência de casos e possibilitar a determinação de sua distribuição espacial e temporal, além de obter informações para auxiliar na elaboração de um programa de saúde animal e saúde pública no Município de Botucatu.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de soro de cães suspeitos de LVC no município de Botucatu, provenientes de animais atendidos no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Veterinário da FMVZ –UNESP, campus de Botucatu/SP, durante o período, de Julho de 2008 a Julho de 2009. Estes animais deveriam atender como definição de caso:

- Suspeito I: Animal residente em Botucatu que apresentasse pelo menos três dos seguintes sintomas: linfadenomegalia, perda de peso, queda de pêlo, formação de crostas, áreas descamadas ou onicogribose.
- Suspeito II: Animal que apresentasse sorologia positiva pela RIFI e ELISA;
- Confirmado: Animal suspeito II com diagnóstico parasitológico positivo, de aspirado de linfonodo.

Quanto à população canina estudada, 284 (55,03%) e 232 (44,97%) eram machos e fêmeas, respectivamente. Quanto a procedência 463 (89,72%) nasceram em Botucatu e 14 (2,64%) eram procedentes de São Paulo, 13 (2,45%) de Pardinho, 9 (1,69%) de São Manuel, 6 (1,13%) de Bauru e 11 (2,07%) sem informação. Quanto a distribuição dos animais quanto ao local de permanência no domicílio, 70 (13,56%) no canil, 203 (39,34%) no domicílio e 243 (47,0%) no peridomicílio.

1- Reação de Imunofluorescência Indireta

A pesquisa de anticorpos anti *Leishmania* spp., foi realizada pela RIFI, segundo Camargo (21). Utilizou-se como antígeno a forma promastigota de *L. major*, mantida no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ, em meio LIT (Liver Infusion Tryptose).

2- Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O teste de ELISA foi realizado utilizando como antígeno *Leishmania major*, cultivada em 40 mL de meio LIT, durante sete dias em garrafa de ROUX de um litro, mantida a 25°C na posição horizontal. O conteúdo da garrafa foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos em tubo falcon. O sobrenadante foi desprezado e em sequência adicionado 10 mL de PBS homogeneizando e centrifugando-se como anteriormente, repetindo-se essa operação por mais duas vezes. A seguir, o sedimento foi homogeneizado em 10 mL de PBS estéril e congelado a 20°C por 24 horas. As formas promastigotas suspensas foram mantidas a -80°C, até o momento da sonicação. Esta foi realizada em ciclo de 50%, a 4°C por 30 segundos por seis vezes, analisando-se ao microscópio para observar se as formas promastigotas foram quebradas em

pequenos fragmentos. O material obtido foi imediatamente centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos sob refrigeração a 4°C, e o sobrenadante resultante foi usado como antígeno, no qual foi adicionado PMSF (Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride) 250 mM, que é um inibidor de protease para a conservação das proteínas. O antígeno foi testado com amostras de soro de cães sabidamente positivos e negativos, para testar sua viabilidade.

Para a sensibilização das placas de ELISA, de poliestireno, de fundo chato, foram usados três microgramas de antígeno por poço totalizando 300 microgramas por placa. As mesmas foram mantidas em câmara úmida sob refrigeração, de um dia para o outro e posteriormente lavadas quatro vezes com solução de lavagem. Após secagem, foram incubadas com 150 µL de PBSC (tampão bloqueio) por uma hora em estufa a 37°C. Desprezou-se o tampão e a placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem e seca. Os soros testes foram diluídos em solução PBSC a 1:40 (195 µL de PBSC e 5 µL de soro). Para a diluição 1:80, foram acrescentados 50 µL de PBSC e 50 µL da diluição de 1:40. Da mesma maneira, foram diluídos dois controles positivos e quatro negativos, e dois testemunhos com 100 µL de PBSC. Após as diluições, a placa permaneceu na estufa 37°C por 30 minutos. Depois foi lavada quatro vezes com solução de lavagem para retirada do excesso de soro e secada. O conjugado imunoenzimático usado foi uma antiimunoglobulina de cão, fração IgG, marcada com peroxidase (Sigma-Company USA), previamente titulado. Após o preenchimento de cada poço com 100 µL da solução de PBSC e conjugado, a placa foi incubada por 30 minutos a 37°C e em seguida lavadas com solução de lavagem por quatro vezes. Em seguida foram adicionados 100µL de substrato (5mg de -O-fenilenodiamino- OPD+ 4µL de água oxigenada a 30% + 10 mL de tampão citrato-fosfato) por orifício, e a placa mantida no escuro à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir adicionou-se 30 µL/orifício de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N para interromper a reação. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 492nm. Os resultados foram expressos em valores de densidade óptica (DO).

O ponto de corte foi calculado de acordo com a fórmula: $CO = \text{média CN} \times 2 \times 1,2$, onde CO=Cut-Off; média CN = média da densidade óptica dos orifícios do controle negativo; 2 = fator de correção; 1,2 = número multiplicado ao valor do cut-off para embutir a zona cinza no ponto de corte.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras foram negativas para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp., em ambos os testes (RIFI e ELISA), apesar das alterações clínicas, de acordo com a tabela 1, devido a outras enfermidades ou dermatopatias, na medida em que tratavam-se de animais atendidos no Ambulatório de Dermatologia do HV.

Os resultados do inquérito sorológico sugerem que o município de Botucatu continua indene para LVC, o que já foi demonstrado em pesquisa prévia (1). Apesar dos animais apresentarem alterações sugestivas de LVC nenhum foi positivo nos testes utilizados, que são recomendados oficialmente. Enfatiza-se que casos importados de LVC já foram diagnosticados no Hospital Veterinário da FMVZ- Botucatu (4), justificando-se a importância das ações de vigilância epidemiológica e sanitárias referentes a esta enfermidade no município.

Os resultados deste estudo possibilitam também sugerir que até o momento do presente estudo o vetor, *Lutzomyia longipalpis*, não se encontra no município. Especula-se que condições climáticas, altitude ou outros fatores ambientais sejam desfavoráveis para a sua manutenção, ao se considerar a proximidade de Botucatu com municípios endêmicos e epidêmicos, e o diagnóstico de casos importados em cães que residiam em Botucatu há algum tempo (4).

Não há nenhuma forma de controle quanto ao trânsito de cães possivelmente infectados entre áreas endêmicas e não endêmicas. A proximidade entre cidades indenas e regiões onde a

doença ocorre associada às condições climáticas e fisiográficas propícias à manutenção da enfermidade, e a falta de controle quanto ao trânsito de cães provenientes de outras localidades, contribui para o risco de introdução e difusão da LVC (22), destacando-se a importância de um sistema de vigilância para a detecção precoce, no caso de sua introdução no município.

A movimentação de cães de um município para outro é um fator de risco importante na epidemiologia da LVC. No presente estudo, 53 (10,27%) dos animais eram procedentes de outros municípios e seis (11,32%) deles procediam de Bauru, onde a enfermidade ocorre de forma epidêmica (9).

Na tabela 1 pode-se observar que muitos animais apresentavam vários sinais clínicos que são clássicos na LVC como: onicogribose, emagrecimento, queda de pêlos, hepatoesplenomegalia, entre outros, porém não são específicos podendo ser comuns a outras enfermidades. A realização de inquéritos sorológicos caninos (amostrais ou censitários), além de sua função de controle do reservatório canino em áreas extensas, tem papel fundamental na detecção de focos silenciosos da doença e na delimitação de regiões ou setores de maior prevalência, onde a execução das medidas de controle é necessária (23).

Tabela 1. Alterações encontradas nos animais examinados na clínica de pequenos animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu.

Sinais Clínicos	N	%
Queda de pelos	428	82,94
Emagrecimento	423	81,97
Áreas de descamação	421	81,58
Crostas na pele	326	63,17
Úlceras/ferimentos crônicos na pele	299	57,94
Linfadenomegalia	192	37,20
Onicogribose	99	19,18
Hepatoesplenomegalia	89	17,24

Resultados mais práticos quanto ao controle da LVC deverão ser obtidos com o aprimoramento do conhecimento epidemiológico das características locais da enfermidade, especialmente quanto ao papel dos cães, humanos e animais silvestres, como reservatórios, para a continuidade do ciclo de transmissão da *L. chagasi* em áreas onde as medidas de controle preconizadas são corretamente executadas (23).

A relevância dos inquéritos soroepidemiológicos pode ser confirmada, pela análise da soroprevalência da LVC em cães domiciliados na zona urbana de Cuiabá com a prevalência estimada em quatro bairros estudados de 3,4%. Os autores concluíram que os principais fatores de risco identificados na ocorrência da infecção canina na cidade de Cuiabá, foram a localização dos cães no peridomicílio, bem como a proximidade das residências com matas, evidenciando mudanças na ocorrência da doença no ambiente urbano (24).

Além da importância dos inquéritos soroepidemiológicos são essenciais as atividades de educação em saúde, transmitindo para a população informações sobre a doença no cão e em humanos, envolvendo amplamente a comunidade, utilizando-se veículos de comunicação disponíveis, bem como a realização de palestras em escolas, e entidades de classe enfocando principalmente os aspectos epidemiológicos e de controle (1). É relevante ainda a utilização de coleiras repelentes em cães, principalmente nas situações com grande dispersão dos flebotômicos transmissores, sendo importantes ainda os inquéritos entomológicos na pesquisa de espécies de flebotômicos presentes no município.

CONCLUSÃO

Conclui-se que as ações de vigilância a partir de inquéritos soro epidemiológicos são importantes para o conhecimento da situação epidemiológica da LVC nos municípios e que apesar do resultado negativo no universo amostral pesquisado, estas ações devem ser permanentes, pois a Rodovia Marechal Rondon, considerada rota de dispersão da LVC no Estado de São Paulo, contorna grande parte do município de Botucatu. Além disso, a partir destas ações se torna possível monitorar a aparecimento de casos de maneira rápida e eficiente, obtendo desta forma informações para a elaboração de um programa de saúde animal e saúde pública no Município de Botucatu.

REFERÊNCIAS

1. Langoni H, Tome RO, Gaio FC, Generoso D, Menozzi BD. Epidemiological vigilance for canine Leishmaniasis in the country of Botucatu. *Ars Vet.* 2001;17:196-200.
2. World Health Organization. Information on leishmaniosis [Internet]. 2004 [cited 2005 Mar 22]. Available from: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.html>
3. Vargas-Diaz E, Yépez J. Aspectos epidemiológicos de la Leishmaniasis visceral en Venezuela, con especial referencia al estado Falcón. *Bol Malariol Salud Ambient.* 2004;44:9-19.
4. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília-DF: MS/SVS; 2005.
5. Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte. *Cad Saude Publica.* 2001;17:1231-9.
6. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2003.
7. Ikeda FA, Ciarlini PC, Feitosa MM. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba – SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. *Clin Vet.* 2003;47:42-8.
8. Luvizotto MCR. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba-SP. In: *Anais do 20º Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; 1999, Águas de Lindóia. Águas de Lindóia: Anclivepa; 1999. p.24-5.*
9. Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. Coordenadoria de Controle de Doenças. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral americana do estado de São Paulo. São Paulo: SUCEN/CCD; 2006.
10. Camargo-Neves VLF. Leishmaniose visceral americana: doença emergente no estado de São Paulo. Com Ciência – reportagens [Internet]. 2005 [acesso 2006 Jan 31]. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/2005/06/17.shtml>

11. Medeiros IM, Nascimento ELT, Hinrichsen SL. Leishmanioses (visceral e tegumentar). In: Doenças infecciosas e parasitárias - DIP. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.398-409.
12. Genaro O. Leishmaniose visceral americana. In: Parasitologia humana. São Paulo: Atheneu; 2003. p.56-72.
13. Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. Análise clínica e laboratorial em cães eutanasiados no centro de controle de zoonoses de Bauru-SP, com vistas ao diagnóstico da leishmaniose visceral (LV). *Vet Zootec*. 2009;16:343-53.
14. Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol*. 2007;146:235-41.
15. Madeira MF, Serra CMB, Uchoa CMA, Duarte R, Cruz DAM, Perdomo CC. Canine leishmaniasis: a serological survey of 310 dogs in Itaipu, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2002;16:568.
16. Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;93:285-91.
17. Langoni H, Camargo LB. American visceral leishmaniasis: a case report. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005;11:360-72.
18. Organização Panamericana de Saúde. Organização Mundial da Saúde - OPAS/OMS. Informe técnico de la 1ª Conferencia Interamericana para el control de la leishmaniasis. Mexico: Secretaria de Salud; 1987.
19. Palatnik-de-Souza CB, Santos WR, França-Silva JC, Mayrink A W, Genaro O. Impact of canine control in the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *J Trop Med Hyg*. 2001;65:510-7.
20. Oliveira CL, Moraes MHF, Machado-Coelho GLL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control, Belo Horizonte, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2008;24:2953-8.
21. Camargo ME. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev Bras Patol Clin*. 1974;10:143-69.
22. Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of leishmania infantum infection in dogs: comparative study using an immunocromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2352-6.
23. Julião FS, Souza BPMS, Freitas DS, Oliveira LS, Laranjeira DF, Dias-Lima AG, et al. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. *Pesqui Vet Bras*. 2001;27:319-24.

24. Almeida MAO, Jesus EEV, Souza-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;15:106-58.

Recebido em: 10/11/2012

Aceito em: 20/03/2013

COMPORTAMENTO INGESTIVO DE CORDEIROS EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO EM PASTAGEM DE AZEVÉM

Ticiany Maria Dias Ribeiro¹
Alda Lúcia Gomes Monteiro²
Hugo von Linsingen Piazzetta³
Paulo César de Faccio Carvalho⁴
Marina Gabriela Berchiol da Silva⁵
Cláudio José Araujo da Silva⁶
Andressa Santanna Natel⁷
Damaris Ferreira de Souza⁸
Paulo Roberto de Lima Meirelles⁹

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar o comportamento ingestivo de cordeiros, terminados em sistemas de produção em pastagem de azevém (*Lolium multiflorum*) sobressemeado em Tifton 85 (*Cynodon sp*) nos tratamentos: 1- cordeiros desmamados precocemente, aos 40 dias de idade, e mantidos em pastagem de azevém até o abate; 2- cordeiros sem desmame, na mesma pastagem de azevém até o abate; 3- cordeiros sem desmame suplementados em *creep feeding* a partir de 40 dias de idade, na pastagem de azevém, até o abate. Foram realizadas avaliações do comportamento ingestivo dos cordeiros, de agosto a setembro de 2004, verificando as atividades de pastejo, ruminação, amamentação, acesso a *creep feeding* e outras atividades. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições e parcelas subdivididas no tempo, considerando os dias e períodos como subparcelas. Não houve efeito ($p>0,05$) dos tratamentos sobre o tempo de pastejo e amamentação, entretanto, houve redução no tempo de ruminação ($p<0,05$), e elevação do tempo em outras atividades ($p<0,05$) para cordeiros em *creep feeding*. O tempo de pastejo no período da tarde foi superior ($p<0,05$) ao da manhã, sendo que as demais atividades foram distribuídas homogeneamente ao longo do dia. O sistema de produção de cordeiros pode alterar os padrões de comportamento alimentar dos cordeiros, sendo que o pastejo é a atividade que demanda mais tempo dos animais durante o dia.

Palavras-chave: amamentação, *creep feeding*, desmame, ovinos, pastejo, ruminação

¹ Médica Veterinária, Doutora pela Universidade Estadual Paulista – Campus Botucatu., Professora das Faculdades IDEAU - Rua Jacob Gremmelmaier, 215, Centro, Getúlio Vargas-RS, 99.900-000, (54) 3341-6600 ticiany.ribeiro@gmail.com. Contato para correspondência.

² Engenheira Agrônoma, Doutora, Professora do Departamento de Zootecnia da UFPR. aldaufr@gmail.com

³ Engenheiro Agrônomo, Doutor do Programa de Pós Graduação em Agronomia - Produção Vegetal da UFPR. Professor da Universidade Federal da Fronteira Sul. hugo.piazzetta@uffs.edu.br

⁴ Zootecnista, Pós-doutor, Professor do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da UFRGS. paulocfc@ufrgs.br

⁵ Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Zootecnia pela UNESP - Botucatu. gabiberchiol@hotmail.com

⁶ Pós-doutorando do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias - da UFPR. cja001@bol.com.br

⁷ Doutoranda do Departamento de Nutrição Animal, CENA, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP. andressa.zoo@gmail.com

⁸ Mestre do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias - da UFPR. fs.damaris@hotmail.com

⁹ Zootecnista, Doutor, Professor do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da UNESP-Botucatu. paulom@fmvz.unesp.br

INGESTIVE BEHAVIOR OF LAMBS IN PRODUCTION SYSTEMS ON ITALIAN RYEGRASS

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the lambs behavior intake produced in grazing systems on ryegrass pasture (*Lolium multiflorum*) oversown on Tifton-85 (*Cynodon sp*): 1- lambs weaned around 40 days of age in ryegrass pastures until slaughter; 2- lambs without weaning, in the same ryegrass pasture until slaughter; 3- lambs in ryegrass pasture without weaning, supplemented at creep feeding at 1% BW from 40 days of age to slaughter. The lambs ingestive behavior was observed through their grazing, rumination, sucking, creep feeding and other activities from August to September of 2005. The experimental design was completely randomized design with three repetitions and split-plot design on time, considering days and periods of days as subplots. Lambs grazing and suckling time were not affected ($P>0.05$). By systems of production; however, rumination time was reduced ($p<0.05$) and the other activities time ($p<0.05$) increased for creep feeding systems. The grazing time during the afternoon was higher ($p<0.05$) than during the morning, whereas the other activities were distributed homogeneously throughout the day. Meat lambs systems of production may change the ingestive behavior, but the grazing activity keep requiring the most of the time of the animals during the day.

Keywords: creep feeding, grazing, ruminating, sheep, suckling, weaning

COMPORTAMIENTO INGESTIVO DE CORDEROS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN PASTO DE RAIGRÁS

RESUMEN

Este estudio evaluó el comportamiento ingestivo de corderos engordados en sistemas de producción en raigrás (*Lolium multiflorum*) sembrado en Tifton 85 (*Cynodon sp*), como sigue: 1- corderos destetados a los 40 días de edad y en pasto hasta el sacrificio, 2- corderos en el potrero con sus madres hasta sacrificio sin el destete, 3- corderos suplementados durante la lactancia en creep feeding en la pastura de raigrás hasta sacrificio, sin el destete. Se realizaron evaluaciones de la conducta alimentaria de los corderos de Agosto a Septiembre de 2004, con la comprobación de las actividades de pastoreo, rumia, la lactancia materna, el acceso a la suplementación y otras actividades mediante el control temporal durante el día. El diseño experimental fue completamente casual con tres repeticiones y parcelas en el tiempo, teniendo en cuenta los días y los períodos como subparcelas. No se observó efecto ($p> 0,05$) de los sistemas sobre el tiempo de pastoreo y la lactancia, sin embargo, hubo una reducción en el tiempo de rumia ($p <0,05$), y el aumento de tiempo en otras actividades ($p <0,05$) para los corderos en la alimentación privada en creep feeding. El tiempo de pastoreo de la tarde fue superior ($p <0,05$) que en la mañana, y las actividades restantes se distribuyeron de manera uniforme durante todo el día. El sistema de producción de corderos puede cambiar los patrones de conducta de alimentación de los mismos, y el pastoreo es la actividad que exige más tiempo de los animales durante el día.

Palabras clave: lactancia, suplementación, destete, ovejas, pastoreo, rumia

INTRODUÇÃO

O estudo do comportamento de ruminantes em pastejo possibilita a compreensão das relações entre o animal e a pastagem, e é de grande importância no desenvolvimento de estratégias para otimização da produção pecuária (1). Neste sentido, o tempo dos animais em pastejo depende da disponibilidade de forragem, assim como da estrutura e da composição da pastagem, e também do recebimento ou não de suplemento. De acordo com Camargo et al. (2), os animais em pastejo têm preferência pelas folhas jovens, e devido à sua seletividade, se houver baixa disponibilidade de forragem para suprir suas exigências de manutenção e produção, os mesmos poderão compensar o baixo consumo aumentando o tempo de pastejo, a taxa de bocado ou o tamanho do bocado.

Bovinos e ovinos normalmente dividem o seu dia em períodos alternados de pastejo, ruminação e descanso (ócio), destinando em média, cerca de um terço do dia ou 8 horas para cada atividade. Geralmente existem de três a cinco períodos de pastejo durante o dia, sendo o maior e mais intenso realizado depois do amanhecer e antes do entardecer. Entretanto, a maior parte da atividade de pastejo ocorre durante o dia, embora sejam comuns períodos curtos de pastejos noturnos. Conforme Van Rees e Hutson (3) e Zanine et al. (4) existe um período de ruminação após cada período de pastejo, mas a maior parte dela ocorre durante a noite.

Neste sentido, cabe justificar que no caso dos ovinos, os cordeiros que permanecem com suas mães, além destas atividades, realizam aquelas ligadas à amamentação. Assim, em sistemas de produção de cordeiros, a presença da mãe e/ou a amamentação podem ter um papel importante no desenvolvimento e no comportamento dos mesmos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento ingestivo de cordeiros, terminados em três sistemas de produção em pastagem de azevém.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre agosto de 2004 a Janeiro de 2005 no Laboratório de Produção e Pesquisa em Ovinos e Caprinos da UFPR (LAPOC), localizado em Pinhais, Região Metropolitana de Curitiba-PR (latitude 25°25' Sul, longitude 49°8' Oeste e altitude 915m acima do nível do mar). O clima é do tipo Cfb, classificação de Köepen, que corresponde ao Clima Subtropical Úmido (Mesotérmico). O índice pluviométrico é 1.500 mm médios anuais, com temperatura mínima média em julho igual a 8,4°C e máxima média 26,2°C, em fevereiro.

Foram comparados três sistemas de produção de cordeiros em pastagem de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) sobressemeada em Tifton 85 (*Cynodon sp.*), com os tratamentos: (1) cordeiros desmamados aos 40 dias de idade e não suplementados até o abate; (2) cordeiros lactentes não suplementados até o abate; (3) cordeiros lactentes suplementados a 1% do peso corporal (PC) em *creep feeding* a partir de 40 dias de idade.

A área experimental ocupou 2,55 ha, dividida em três piquetes de 0,15 ha, referente ao tratamento 1 e seis piquetes de 0,35 ha referentes aos tratamentos 2 e 3, totalizando nove piquetes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Cada parcela experimental era composta por um piquete contendo seis cordeiros testes, sendo: um cordeiro proveniente de parto simples, dois cordeiros provenientes de parto gemelar, uma cordeira proveniente de parto simples e duas cordeiras provenientes de parto gemelar, totalizando 54 cordeiros.

Foram utilizados cordeiros da raça Suffolk, com idade média de 43 dias e 15,7 kg de peso corporal ao início do experimento.

Após o nascimento, os cordeiros foram pesados e identificados com brinco. Aos 14 dias de idade, os cordeiros e suas mães foram encaminhados à pastagem de azevém e mantidos

nessa área até o início das avaliações, tendo sido vacinados contra ectima contagioso e clostridioses.

Uma semana antes do início da avaliação os cordeiros e suas mães foram encaminhados aos piquetes experimentais para adaptação. Os cordeiros machos foram abatidos ao atingirem o peso de 32 kg após jejum; as fêmeas aos 32 kg foram retiradas da avaliação.

O método de utilização de pastagem foi o pastejo contínuo com lotação variável; os animais testes permaneceram continuamente na área experimental e um número variável de reguladores era utilizado para ajuste de taxa de lotação, realizado a cada 14 dias seguindo a técnica “put and take” descrita por Mott e Lucas (5), procurando manter a massa seca de folhas em 1000 kg/ha, afim de não limitar o consumo.

Os cordeiros suplementados em *creep feeding* receberam ração concentrada farelada contendo 20,4% de proteína bruta (PB), 74,7% de nutrientes digestíveis totais (NDT), 31,6% de fibra em detergente neutro (FDN), 5,8% de fibra em detergente ácido (FDA). A ração concentrada era fornecida uma vez ao dia, às 9 horas da manhã.

A cada 14 dias os animais foram pesados e monitorados com relação às infecções parasitárias, sendo everminados quando a contagem de ovos fosse superior a 700 ovos por grama de fezes.

Foram realizadas duas avaliações de comportamento ingestivo, nos dias 29 de agosto e 11 de setembro de 2004, com início às 6:00 h e término às 18:00 h; no período da manhã entre 6:00 h às 12:00 h e à tarde de 12:05 h às 18:00 h. O método utilizado foi descrito por Jamieson e Hodgson (6), onde a cada 5 minutos era anotada a atividade momentânea dos cordeiros: pastejo, ruminação, amamentação, acesso ao *creep feeding*, outras atividades (consumo de água, relacionamento com outros animais, ócio, caminhar e dormir). Nas datas de avaliação os cordeiros apresentavam idade média de 57 e 70 dias, respectivamente.

Na Tabela 1 são apresentadas os valores médios de quantidade de folhas, colmos e inflorescência referentes às composições morfológica da pastagem nos dias de avaliação, segundo Ribeiro et al. (7).

A análise estatística foi realizada utilizando o modelo de parcelas subdividida considerando os dias de avaliação como subparcelas e os períodos de avaliação como subsubparcelas. A análise de variância e o teste de comparação de médias de Tukey foram realizados pelo *software* estatístico ASSISTAT® 7.5 beta (8), considerando 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora tivesse sido proposta a quantidade de 1000 kg de massa verde seca de folhas por hectare, essa meta não foi alcançada. O requerimento em consumo específico de folhas em pastagem por cordeiros nessa fase não está estabelecido, não sendo possível afirmar se o consumo de folhas foi limitado ou não. Observando o desempenho individual, publicado por Ribeiro et al. (7), nota-se que os cordeiros que não foram desmamados ganharam ao redor de 300 g.dia⁻¹ comparados a 115 g.dia⁻¹ para os desmamados no pasto durante esse período, indicando que o pasto provavelmente não seja a mais importante fonte de nutrientes nessa fase.

Nos dias em que foram realizadas as avaliações de comportamento, a pastagem apresentava maior quantidade de colmos e inflorescência e menor quantidade de folhas (Tabela 1), caracterizando o estágio reprodutivo da pastagem. No segundo dia de avaliação houve redução da massa de lâminas foliares devido à seca ocorrida neste período e ao ataque de lagartas (*Pseudaletia sequax*) à pastagem. As condições climáticas foram desfavoráveis durante o período experimental, especialmente entre agosto e outubro, com precipitação pluviométrica média em 1,76 mm, segundo dados do Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR), levando ao desenvolvimento muito precoce da fase reprodutiva do azevém,

Ribeiro TMD et al. Comportamento ingestivo de cordeiros em sistemas de produção em pastagem de Azevém. Vet. e Zootec. 2014 mar.; 21(1): 117-126.

ainda no início de setembro, o que normalmente deveria acontecer no mês de novembro, já que o final de ciclo ocorre nesse mês (1).

Tabela 1. Composição morfológica da pastagem de azevém nos dias 29/08/04 e 11/09/04

Componente Morfológico	29/08/04	11/09/04
	Kg MS/ha	
Lamina foliar	562,3	274,3
Colmos e bainhas	1065,2	945,9
Inflorescência	8,3	45,85

Fonte: adaptado de Ribeiro et al., 2009 (7).

Na Tabela 2 encontram-se as médias estimadas e erro padrão das médias do tempo diário de pastejo, ruminação, amamentação, alimentação em *creep feeding* e outras atividades dos cordeiros nos diferentes sistemas de produção.

O tempo médio destinado ao pastejo foi de 389,2 min (Tabela 2), o que correspondeu a 54% das atividades diárias. Entretanto, os sistemas de produção não tiveram efeito ($p>0,1$) sobre o tempo de pastejo dos cordeiros, indicando que a presença da mãe e o fornecimento de ração concentrada em 1% de peso corporal (PC) em *creep feeding*, não reduziram o tempo em pastejo. Piazzetta et al. (9) avaliando cordeiros lactentes em diferentes sistemas de suplementação obtiveram redução no tempo de pastejo quando fornecida ração concentrada em 2% do PC em *creep feeding* em comparação aos não suplementados, atribuindo esse resultado ao possível efeito de substituição da pastagem pelo concentrado, o que provavelmente não ocorreu neste trabalho devido ao menor nível de suplementação. Já Bremm et al. (10) observaram aumento de 23% no tempo de pastejo de bezerras pastejando aveia e azevém com suplementação de 1% PC, contrapondo os demais resultados.

Neste trabalho, a baixa qualidade e quantidade da pastagem oferecida, possivelmente não deixaram o efeito dos sistemas se expressar. Bremm et al. (11) afirmaram que o material selecionado pelos animais em pastejo depende de vários fatores, entre eles a disponibilidade de folhas no relvado; pois, quando o animal tem a possibilidade de consumir folhas, procura por estas, mesmo quando a proporção na pastagem é baixa, influenciando o comportamento de pastejo.

No segundo dia avaliado, o tempo em pastejo foi superior ($p<0,01$), (Tabela 2). Isto provavelmente ocorreu pelo aumento da necessidade diária de ingestão de forragem ocasionada pelo crescimento corporal dos cordeiros, e também possivelmente pela redução da quantidade de folhas presente na pastagem (Tabela 1), exigindo que os cordeiros elevassem o tempo em pastejo para atingir um nível adequado de ingestão de nutrientes. Gontijo Neto et al. (12) afirmam que em pastejo, os animais demonstram preferência por locais com massa de forragem e altura elevadas, com maior concentração de nutrientes para otimizar o consumo de forragem, a menos que essa maior altura e massa estejam associados ao desenvolvimento reprodutivo e forragem de baixo valor nutritivo. Independente do sistema de produção avaliado, o tempo de pastejo correspondeu à atividade que mais demandou tempo durante o dia. Sendo que este resultado foi semelhante ao encontrado na literatura (2).

O tempo médio em ruminação foi de 162,9 min correspondendo a 23% das atividades diárias. Os cordeiros em *creep feeding* passaram 92,4 min ruminando sendo este tempo, inferior ($p=0,014$) aos demais sistemas (Tabela 2). Piazzetta (13), avaliando o comportamento ingestivo de cordeiros desmamados recebendo níveis crescentes de suplemento observou redução de 1% no tempo de ruminação a cada unidade percentual de elevação no fornecimento do suplemento concentrado. Euclides e Medeiros (14) afirmam que a adição de pequenas quantidades de carboidratos não estruturais na dieta pode proporcionar benefícios aos micro-organismos ruminais pelo fornecimento de energia e aumentando a eficiência destes, reduzindo o tempo em ruminação, confirmando os resultados aqui obtidos.

Tabela 2. Médias estimadas e erro padrão da média para tempo diário (min) destinado ao pastejo, ruminação, mamada, alimentação em creep feeding e outras atividades de cordeiros terminados em diferentes sistemas de produção.

Sistema de produção	Datas	Cordeiro			Média	Epm*
		desmamado	lactente	<i>Creep feeding</i>		
Minutos						
Pastejo	29/Ago	379,4	350,8	311,4	347,2 ^B	12,9
	11/Set	462,8	457,8	372,7	431,1 ^A	18,7
	Média	421,1	404,3	342,0	389,2	15,0
Ruminação	29/Ago	216,7	197,8	122,2	178,9	16,0
	11/Set	201,1	176,2	63,5	146,9	23,8
	Média	208,9 ^a	187,0 ^a	92,9 ^b	162,9	14,38
Amamentação	29/Ago	-	6,1	3,6	4,86	1,01
	11/Set	-	9,1	8,6	8,83	1,80
	Média	-	7,6	6,1	6,8	1,07
<i>Creep feeding</i>	29/Ago	-	-	36,4	36,4	6,3
	11/Set	-	-	109,8	109,8	21,48
	Média	-	-	73,1	73,1	24,1
Outras atividades	29/Ago	132,5	179,2	251,1	187,6 ^A	19,4
	11/Set	61,1	80,3	164,0	101,8 ^B	16,4
	Média	96,8 ^b	129,7 ^b	207,6 ^a	144,7	16,12

Médias seguidas de letras maiúscula diferentes na coluna (datas) diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras minúscula diferentes na linha (sistemas) diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

* Erro padrão da média

Van Soest (15) indica que o tempo de ruminação é influenciado pela natureza da dieta e parece ser proporcional ao teor de parede celular dos volumosos. Da mesma forma, Dado e Allen (16) declaram que a forma física da dieta influencia nos processos de mastigação e ruminação, sendo que alimentos concentrados reduzem o tempo de ruminação, enquanto que volumosos com alto teor de parede celular tendem a aumentar o tempo de ruminação.

Nos sistemas onde os cordeiros permanecem junto às mães, o tempo médio em amamentação foi de 6,8 min o que corresponde a 1% das atividades diárias, sendo que o fornecimento de ração concentrada em *creep feeding*, não afetou ($p > 0,1$) o tempo de amamentação (Tabela 2). Esses resultados foram semelhantes aos observados por Piazzetta (13) que não encontrou diferença no tempo de amamentação comparando os sistemas de cordeiros lactentes, em *creep feeding* e em *creep grazing*. Considera-se ainda que, como as datas de avaliações foram bem próximas, isso pode ter influenciado na não observação no efeito dos sistemas sobre a amamentação entre os dias avaliados.

Gordon e Siegmann (17) afirmam que nas primeiras semanas de vida os cordeiros mamam de 1 a 2 vezes por hora e cada mamada tem duração de aproximadamente 3 minutos. Quando os animais vão crescendo, a frequência das mamadas vai diminuindo, provavelmente pela diminuição de leite da ovelha e também pelo fato dos cordeiros gastarem 50% do tempo se alimentando por meio de outras fontes de nutrientes (pastagem ou ração). Os autores também ressaltam que a partir da 5ª semana de vida os cordeiros vão mamar uma vez a cada

duas horas e entre a 8^a e 10^a semanas de vida, apenas 25% dos nutrientes consumidos pelos cordeiros será proveniente do leite materno.

Comparando três sistemas de produção de cordeiros com idade entre 50 e 60 dias, em pastagem de Tifton-85, Poli et al. (18) afirmaram que o tempo gasto com a amamentação foi relativamente baixo (6,7% do tempo para os cordeiros com suas mães sem *creep feeding* e 5,8% do tempo para os suplementados), concordando com o trabalho em questão.

Foi notado que a avaliação do tempo de amamentação por meio da metodologia de anotação da atividade momentânea, com intervalos de 5 ou 10 minutos, pode não ser a melhor forma de registro dessa atividade, e talvez fosse mais adequado o uso de observação contínua do comportamento nesse caso. Segundo Martin e Bateson (19), o método mais propício para avaliar o tempo de mamada de determinada espécie animal é mensurar a duração desta atividade.

Apesar disso, e mesmo não tendo sido mensuradas a quantidade de leite ingerida e suas propriedades nutricionais, pode-se afirmar que a presença da mãe foi importante para os cordeiros nessa fase em função do desempenho individual. Ribeiro et al. (20) mostraram que o desempenho dos cordeiros lactentes independente de receberem suplementação é mais elevado que os cordeiros desmamados em pastagem.

Para o sistema em *creep feeding*, o tempo que os cordeiros permaneceram consumindo o suplemento foi de 73,1 min, correspondendo a 10% das atividades diárias dos cordeiros (Tabela 2).

O tempo médio em outras atividades foi de 144,7 min correspondendo a 20% das atividades diárias dos cordeiros, sendo que o sistema de *creep feeding* possibilitou a elevação ($p=0,0103$) do tempo em outras atividades para 207,6 min (Tabela 2). Isso possivelmente ocorreu devido à tendência do tempo de pastejo destes cordeiros ser inferior aos demais.

Na Tabela 3, apresenta-se o tempo para as atividades de pastejo, ruminação, amamentação, alimentação em *creep feeding* e outras atividades, nos períodos da manhã e tarde, dos cordeiros nos sistemas de produção. Obteve-se tempo de pastejo, no período da tarde, de 217,9 min e no período da manhã, de 171,2 min. O maior ($p<0,001$) tempo de pastejo no período da tarde provavelmente ocorreu em função de que às temperaturas estavam mais amenas no final da tarde. Starling et al. (21) concluíram que a temperatura mais amena após as 16:00 horas foi responsável pelo maior tempo em pastejo no período da tarde. Da mesma forma, Champion, Rutter e Penning (22) afirmam que, no final da tarde, ocorre maior concentração de matéria seca e carboidratos solúveis nas folhas devido aos processos fotossintéticos ocorridos durante o dia, sendo este outro fator que possivelmente elevou o tempo em pastejo no período da tarde.

As demais atividades realizadas pelos cordeiros demandaram menor tempo durante o dia em relação ao pastejo e foram distribuídas de forma homogênea entre os períodos da manhã e tarde (Tabela 3). Isto indica que possivelmente a maior ocorrência destas atividades seja no período noturno, não avaliado neste experimento. Sarmento (23) observou em bovinos em pastagem tropical, um período de ruminação após cada período de pastejo, porém com maior concentração daquela atividade durante a noite. Da mesma forma, Zanine et al. (24) obtiveram maior tempo de ócio e ruminação no período noturno.

Tabela 3. Médias estimadas e erro padrão da média para tempo (min) destinado ao pastejo, ruminação, mamada, alimentação em creep feeding e outras atividades durante os períodos da manhã e tarde, para os cordeiros terminados em diferentes sistemas de produção

Sistema de produção	Períodos	Cordeiro	Cordeiro	Creep	Média	Epm*
		desmamado	lactente	feeding		
Minutos						
Pastejo	Manhã	193,9	180,6	139,3	171,2 ^B	12,9
	Tarde	227,2	223,8	202,8	217,9 ^A	18,7
	Média	210,6	202,2	171,0	194,6	15,8
Ruminação	Manhã	103,1	91,7	42,6	79,1	16,0
	Tarde	105,8	95,3	50,3	83,8	23,8
	Média	104,4	93,5	46,4	81,5	19,9
Amamentação	Manhã	-	4,1	3,4	3,7	0,9
	Tarde	-	3,5	2,7	3,1	1,6
	Média	-	3,8	3,0	3,4	1,3
Creep feeding	Manhã	-	-	39,1	39,1	6,0
	Tarde	-	-	34,0	34,0	39,0
	Média	-	-	36,5	36,5	22,5
Outras atividades	Manhã	39,6	58,7	110,9	69,7	19,4
	Tarde	57,2	71,0	96,7	75,0	16,4
	Média	48,4	64,9	103,8	72,3	17,9

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna (sistemas) diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na linha (períodos) diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

* Erro padrão da média

CONCLUSÃO

O sistema de produção de cordeiros afeta as atividades comportamentais dos cordeiros, sendo que a inclusão da ração farelada na dieta dos cordeiros lactentes reduz o tempo de ruminação. As atividades realizadas pelos animais ao longo do dia são distribuídas de forma homogênea sem sofrer efeito de turno, exceto quanto ao pastejo. Em situações de menor disponibilidade e qualidade da forragem, os animais apresentam estratégias alimentares compensatórias, aumentando o tempo de pastejo visando manter a ingestão de forragem.

REFERÊNCIAS

1. Flores RA, Dall' Agnol M, Nabinger C, Montardo DP. Produção de forragem de populações de azevém anual no Estado do Rio Grande do Sul. Rev Bras Zootec. 2008;37:1168-75.
2. Camargo DG, Rocha MG, Kozloski GV, Elejalde DG, Bremm C, Pötter L, et al. Consumo de forragem por cordeiras suplementadas em pastagem de milheto. Cienc Rural. 2009;39:509-14.
3. Van Rees H, Hutson GD. The behaviour of free-ranging cattle on an alpine range in Australia. J Range Manage. 1983;36:740-3.
4. Zanine AM, Santos EM, Parente HN, Ferreira DJ, Cecon PR. Comportamento ingestivo de bezerros em pastos de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens*. Cienc Rural. 2006;36:1540-5.

5. Mott GO, Lucas HL. The design, conduct and interpretation of grazing trials on cultivated and improved pastures. In: Proceedings of the 6° International Grassland Congress; 1952, Pennsylvania. Pennsylvania: State College Press; 1952. p.1380-5.
6. Jamieson WS, Hodgson J. The effect of daily herbage allowance and sward characteristics upon the ingestive behaviour and herbage intake of calves under strip-grazing dairy cows. *Grass Forage Sci.* 1979;34:69-77.
7. Ribeiro TMD, Monteiro ALG, Poli CHEC, Moraes A, Silva ALP, Barros CS. Características da pastagem de azevém e produtividade de cordeiros em pastejo. *Rev Bras Zootec.* 2009;38:580-7.
8. Assistência Estatística. ASSISTAT - Versão 7.5 beta [Internet]; 2008 [acesso 2009 Fev 13]. Disponível em: <http://www.assistat.com/indexp.html>
9. Piazzett HVL, Monteiro ALG, Ribeiro TMD, Carvalho PCF, Dittrich JR, Silva CJA. Comportamento ingestivo e consumo de forragem de cordeiros em terminação a pasto. *Acta Sci Anim Sci.* 2009;31:227-34.
10. Bremm C, Rocha MG, Rastle J, Pilau A, Montagner DB, Freitas FK, et al. Efeito de níveis de suplementação sobre o comportamento ingestivo de bezerras em pastagem de Aveia (*Avena strigosa* Schreb.) e Azevém (*Lolium multiflorum* Lam.). *Rev Bras Zootec.* 2005;34:387-97.
11. Bremm C, Silva JHS, Rocha MG, Elejalde DAG, Oliveira Neto RA, Confortin ACC. Comportamento ingestivo de ovelhas e cordeiras em pastagem de azevém-anual sob níveis crescentes de suplementação. *Rev Bras Zootec.* 2008;37:2097-106.
12. Gontijo Neto MM, Euclides VPB, Nascimento Junior D, Miranda LF, Fonseca DM, Oliveira MP. Consumo e tempo diário de pastejo por novilhos Nelore em pastagem de capim-tanzânia sob diferentes ofertas de forragem. *Rev Bras Zootec.* 2006;35:60-6.
13. Piazzetta HVL. Comportamento ingestivo de cordeiros em sistemas de suplementação [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2009.
14. Euclides VPB, Medeiros SR. Suplementação animal em pastagens e seu impacto na utilização da pastagem. In: Pedreira CGS, Moura JC, Silva SC, Faria VP, editores. Anais do 22° Simpósio sobre Manejo de Pastagens; 2005, Piracicaba. Piracicaba: FEALQ; 2005. p.33-70.
15. Van Soest PJ. Intake. In: Nutricional ecology of the ruminant. Gevallis: O&B Books; 1994. cap.21, p.337-53.
16. Dado RG, Allen MS. Variation in and relationship among feeding, chewing, and drinking variables for lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 1995;77:132-44.
17. Gordon K, Siegmann M. Suckling behaviour of ewes in early lactation. *Physiol Behav.* 1991;50:1079-81.

18. Poli CHEC, Monteiro ALG, Gomes CS, Dittrich JR, Gilaverte, Piazzetta HVL. Grazing behaviour of lambs submitted to different production systems. In: Proceedings of the 20^o International Grassland Congress; 2005, Ireland. Ireland: United Kingdom; 2005. p.514.
19. Martin P, Bateson P. Measuring behaviour. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.
20. Ribeiro TMD, Monteiro ALG, Prado OR, Natel AS, Salgado JA, Piazzetta, HVL, et al. Desempenho animal e características das carcaças de cordeiros em quatro sistemas de produção. Rev Bras Saude Prod Anim. 2009;10:366-78.
21. Starling JMC, Silva RG, Ceron-Munoz M, Barbosa GSSC, Costa MJRP. Análise de algumas variáveis fisiológicas para avaliação do grau de adaptação de ovinos submetidos ao estresse por calor. Rev Bras Zootec. 2002;31:2070-7.
22. Champion RA, Rutter SM, Penning PD. Temporal variation in grazing behavior of sheep and the reliability of sampling periods. Appl Anim Behav Sci. 1994;42:99-108.
23. Sarmiento DOL. Comportamento ingestivo de bovinos em pasto de capim-marandu submetidos a regime de lotação contínua [dissertação]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo; 2003.
24. Zanine AM, Santos EM, Parente HN, Ferreira DJ, Cecon PR. Comportamento ingestivo de bezerros em pastos de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens*. Cienc Rural. 2006;36:1540-5.

Recebido em: 16/02/2012

Aceito em: 07/11/2013

A SUBSTITUIÇÃO DO MEIO TCM PELO MEIO BARC, SUPLEMENTADO COM SFB, BSA OU PVA, PARA A MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS *IN VITRO*, NÃO INCREMENTA A SUBSEQUENTE PRODUÇÃO DE BLASTOCISTOS

Jéssica de Oliveira Caldeira¹
Diego Gouvêa de Souza²
Renata Sanches Calegari²
Daniela Martins Paschoal²
José Mateus Sudano²
Alicio Martins Júnior¹

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência do meio de cultivo de embriões bovinos “Beltsville Agriculture Research Center” (BARC), suplementado com SFB, BSA e PVA, separadamente, sobre a maturação de oócitos *in vitro*, evidenciada pela taxa de clivagem e formação de blastocistos em diferentes estágios de desenvolvimento. Três experimentos foram efetuados, de acordo com o seguinte delineamento experimental: exp.1: SFB foi adicionado ao meio BARC nas concentrações de 0, 5 e 10%; exp. 2: BSA foi adicionada ao meio BARC nas concentrações de 0, 4 e 8 mg/mL; exp. 3: PVA foi adicionado ao meio BARC nas concentrações de 0, 0,5 e 1 mg/mL. O meio de cultura TCM 199, acrescido de bicarbonato, piruvato, gentamicina, FSH, LH e SFB, foi utilizado como grupo controle. Os oócitos, obtidos de ovários de vacas destinadas ao abate comercial, foram selecionados em meio PBS e, a seguir, maturados em meio BARC acrescido de FSH, LH, gentamicina e as respectivas macromoléculas. A seleção espermática foi realizada em gradiente de Percoll, utilizando o meio TALP para a FIV. O cultivo *in vitro* dos embriões foi em meio SOF modificado; todas as etapas foram realizadas em incubadora a 5% de CO₂ em ar, a 38,7 °C, atmosfera úmida. O número de oócitos que clivou e atingiu os estágios de blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido foi registrado, respectivamente, as 72 e 168 horas pós-inseminação. ANOVA e teste *t* de Bonferroni foram empregados para a análise estatística, com P<0,05 sendo considerado significativo. Maior porcentagem (P<0,05) de oócitos que clivaram foi observada no grupo TCM + SFB do que nos grupos maturados em meio BARC com SFB ou BSA, independentemente da concentração adotada. Contudo, a taxa de fertilização foi similar entre os grupos BARC + PVA com 1 mg/mL (85,7%) e TCM + SFB (90,8%). Diferença significativa (P<0,05) foi constatada entre os grupos para o desenvolvimento de blastocistos, com o grupo TCM + SFB produzindo um maior número de blastocistos, em diferentes estágios (resultados variando de 47,4 a 51,4%) em comparação com os grupos utilizando BARC + SFB (4,1 a 19,7%), BSA (1,4 a 5,6%) e PVA (5,7 a 10,6%). Concluindo, o meio BARC suplementado com diferentes fontes de macromoléculas não foi eficiente em promover adequada maturação dos oócitos bovinos *in vitro*, resultando em uma baixa taxa de fertilização e de produção de blastocistos, em comparação com o meio TCM + SFB.

Palavras-chave: meio TCM, meio BARC, maturação de oócitos, bovinos

¹ Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Laboratório de Biotecnologia de Reprodução Animal - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP. Correspondência

² Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

REPLACING TCM WITH BARC MEDIUM SUPPLEMENTED WITH FCS, BSA OR PVA FOR *IN VITRO* OOCYTE MATURATION DID NOT SUPPORT SUBSEQUENT BLASTOCYST PRODUCTION

ABSTRACT

This study was carried out to assess the influence of bovine embryo culture medium Beltsville Agriculture Research Center (BARC), supplemented with FCS, BSA or PVA, on the *in vitro* oocyte maturation, evidenced by cleavage rate and blastocysts production at different developmental stages. Three experiments were performed, as follows: exp.1: addition of FCS to BARC medium at concentrations of 0, 5 and 10%; exp. 2: addition of BSA to BARC medium at concentrations of 0, 4 and 8 mg/ml; exp. 3: addition of PVA to BARC medium at concentrations of 0, 0.5 and 1.0 mg/ml. TCM 199 supplemented with bicarbonate, pyruvate, gentamicin sulfate, FSH, LH and FCS was used as control group. Oocytes obtained from cow ovaries at slaughterhouse were selected in PBS, and then matured in BARC medium supplemented with FSH, LH and gentamicin sulfate, according to the experimental design. Percoll gradient was used for sperm selection and TALP medium for IVF. *In vitro* embryo culture was in SOF-m medium; a humidified atmosphere with 5% CO₂, in air, at 38.7°C was used for all steps. The number of oocytes reaching blastocyst, expanded blastocyst, and hatched blastocyst stages was recorded, respectively at 72 and 168 h post-insemination. ANOVA and Bonferroni *t* test were used to determine differences among groups. Differences of $P < 0.05$ were taken as significant. Higher percentage ($P < 0.05$) of cleaved oocytes was observed in group TCM + FCS than for the other groups matured in BARC supplemented with FCS or BSA, regardless the concentration used. However, the cleavage rate was similar between groups BARC plus PVA with 1 mg/ml (85.7%) and TCM + FCS (90.8%). Significant difference was found among groups for the production of blastocysts, with the control group yielding a higher number of blastocysts (results ranging from 47.4 to 51.4%, in comparison with groups using BARC + FCS (4.1 to 19.7%), BSA (1.4 to 5.6%) and PVA (5.7 to 10.6%). In conclusion, BARC medium supplemented with different macromolecules did not promote a beneficial effect on *in vitro* oocyte maturation, resulting in lower rate of cleavage and blastocyst production when compared with TCM + FCS medium.

Keywords: TCM medium, Barc medium, oocyte maturation, bovines

SUSTITUCIÓN DE TCM POR BARC, ENRIQUECIDO CON SFB, BSA O PVA, PARA LA MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS *IN VITRO* NO INCREMENTA LA PRODUCCIÓN POSTERIOR DE BLASTOCISTOS

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo verificar la influencia del medio de cultivo de embriones bovinos "Beltsville Agriculture Research Center" (BARC), complementado con SFB, BSA o PVA, en la maduración *in vitro* de ovocitos, evidenciado a través de la tasa de fecundación y formación de blastocistos en diferentes etapas de desarrollo. Se realizaron tres experimentos, a saber: EXP 1: SFB añadido al medio BARC en concentraciones de 0, 5 y 10%; EXP 2: BSA añadido al medio BARC en concentraciones de 0, 4 y 8 mg/ml; EXP. 3: PVA se utilizó en el medio BARC en concentraciones de 0, 0.5 y 1 mg/ml. El medio de cultivo TCM 199 con piruvato, gentamicina, FSH, LH y SFB se utilizó como grupo control. Los ovocitos, obtenidos de ovarios de vacas enviadas al matadero, se seleccionaron en medio PBS y luego fueron madurados en medio BARC con FSH, LH, gentamicina y distintas

macromoléculas. La selección del esperma se hizo con gradiente de Percoll, utilizando el medio TALP para la fecundación *in vitro*. Los embriones fueron cultivados en medio SOF modificado; ovocitos y embriones fueron incubados a 38,7°C, 5% de CO₂ en aire y atmosfera húmeda. El número de ovocitos que fertilizaron y alcanzaron los estadios de blastocisto, blastocisto expandido y blastocisto eclosionado, respectivamente, se registraron 72 y 168 horas post inseminación. Análisis de varianza y la prueba t de Bonferroni se utilizaron para el análisis estadístico, con $P < 0.05$. Porcentaje más alto ($P < 0.05$) de ovocitos que clivaron fue observada en el grupo TCM + SFB que en los grupos madurados en medio BARC con SFB o BSA, independientemente de la concentración utilizada. Sin embargo, la tasa de fecundación fue similar entre grupos BARC + PVA con 1 mg/ml (85,7%) y TCM + SFB (90,8%). Diferencia significativa ($P < 0.05$) se encontró entre los grupos para el desarrollo de blastocistos, con el grupo TCM + SFB produciendo un mayor número de blastocistos, en diferentes estadios (resultados que van desde 47,4 a 51,4%) en comparación con los grupos utilizando BARC + SFB (4,1 a 19,7%), BSA (1,4 a 5,6%) y PVA (5,7 a 10,6%). En conclusión, el medio BARC complementado con diferentes macromoléculas no fue eficiente en la promoción de una adecuada maduración de ovocitos bovinos *in vitro*, resultando en una tasa de fecundación y producción de blastocistos baja, en comparación con el medio TCM con SFB.

Palabras clave: medio TCM, medio BARC, maduración de ovocitos, bovinos

INTRODUÇÃO

Desde o primeiro sucesso de fertilização *in vitro*, em bovinos (1), muitos pesquisadores têm direcionado estudos para definir as condições ideais de cultura de embriões, contudo, o aprimoramento do meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, ainda se faz necessário, uma vez que a taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de pré-implantação raramente ultrapassa 30-40%.

As condições de cultura utilizadas para dar suporte à MIV alteram profundamente o subsequente desenvolvimento do embrião (2), diminuindo a oferta de oócitos competentes. A MIV de oócitos é uma etapa limitante na produção *in vitro* (PIV) de embriões. Em condições *in vivo*, a maturação oocitária é um processo induzido, altamente orquestrado, no qual o aprisionamento meiótico, mediado pelo c-AMP, é sobrepujado pela onda de gonadotrofina antes da ovulação (3).

Segundo Van Blerkom, Bell e Weipz (4), a competência para o desenvolvimento do oócito está relacionada com a organização do citoplasma ao estágio de vesícula germinativa. A maturação do oócito envolve a retomada da meiose, a partir da prófase I (estágio de vesícula germinativa) até a extrusão do primeiro corpúsculo polar (metáfase II), expansão das células do *cumulus* e maturação do citoplasma para dar suporte à fertilização e ao desenvolvimento do embrião (5). O estágio final de maturação do oócito é de natureza dinâmica, significando que os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) requerem diferentes componentes, tais como: ácidos graxos, aminoácidos, eletrólitos, purinas, pirimidinas e metabólitos. Os CCOs maduros consomem duas vezes mais glicose, oxigênio e piruvato do que os imaturos (6).

As células do *cumulus* fornecem ao oócito nutrientes e sinais regulatórios que facilitam a progressão da maturação, especialmente, da maturação nuclear. Entretanto, fatores secretados pelo oócito permitem a diferenciação das células do *cumulus*, a partir das células murais da granulosa, além da mucificação da camada de células do *cumulus* (7). Bender et al. (8) demonstraram que, os metabólitos presentes no líquido intrafolicular podem afetar a maturação do oócito e subsequente desenvolvimento até blastocisto. Segundo Gendelman et

al. (9), existe um efeito sazonal deletério sobre a competência de desenvolvimento do oócito, com um maior desenvolvimento embrionário na estação do inverno do que na do verão, com clivagem retardada e variação na expressão gênica na estação quente.

Durante a maturação as mitocôndrias estão sintetizando ATP para que ocorra a síntese proteica necessária para promover a maturação e, posterior, desenvolvimento embrionário (2). De acordo com Yurttas, Morency e Coonrod (10), os oócitos transcrevem e estocam uma grande quantidade de material que não tem um papel seletivo na oogênese, mas, ao contrário, são importantes para a regulação da embriogênese.

O meio de cultura de tecidos TCM 199 é largamente empregado na MIV de oócitos bovinos. Assim, a suplementação com 10% de SFB (11-18), 5% de SFB (19), 3 mg/mL de polivinilpirrolidona (20), 10% de soro de vaca no cio (21), 0,1% de BSA ou 0,1% de PVA (22), 3 mg/mL de BSA ou 10% de SFB (23), 10% de SFB ou 1 mg/mL de PVA (24) tem sido relatada. Porém, trata-se de um meio complexo, com cerca de 60 componentes em sua formulação.

Desta forma, torna-se relevante investigar os efeitos da maturação de oócitos bovinos em meio BARC (25), acrescido de SFB, BSA ou PVA. Este meio tem sido utilizado na etapa de cultura de embriões produzidos a partir de transferência nuclear de células somáticas em procedimento usual de cultivo *in vitro* (CIV) de embriões (26-28). Entretanto, seu emprego como meio base para a MIV de oócitos bovinos não está relatado na literatura, evidenciando o mérito científico e motivação da presente averiguação.

Este estudo teve como objetivo verificar a influência de diferentes concentrações de SFB, BSA e PVA, adicionados separadamente ao meio BARC, sobre a maturação de oócitos bovinos *in vitro*, avaliando-se a taxa de clivagem e o desenvolvimento embrionário até os estágios mais avançados de blastocisto.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita de oócitos e maturação *in vitro* (MIV)

Ovários de vacas foram colhidos de animais abatidos em frigorífico, no máximo 30 minutos após o sacrifício. O transporte foi feito em garrafa térmica contendo solução fisiológica a temperatura de 30 a 33 °C. Folículos de 2 a 7 mm de diâmetro foram puncionados utilizando-se agulha calibre 18 G e seringa de 10 mL. O líquido folicular foi colocado em tubo de centrífuga de 15 mL e mantido a 37 °C, em Banho-Maria, para sedimentação. Todos os procedimentos subsequentes foram conduzidos à temperatura ambiente.

A maturação dos oócitos foi realizada de acordo com Martins Jr., Keskinetepe e Brackett (29), com modificações. Oócitos contendo citoplasma homogêneo e pelo menos 3 a 4 camadas de células do *cumulus* foram lavados (três vezes) e selecionados em meio PBS com sulfato de gentamicina.

Após a seleção, grupos de oócitos foram transferidos aleatoriamente para as gotas de meio de maturação (100 µL), sob óleo mineral. Dois meios base foram utilizados para a MIV. O meio TCM, suplementado com bicarbonato de sódio, piruvato, glutamina, penicilina, 1 µg/mL de FSH (Folltropin-V®, Bioniche Inc, Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin®, Bioniche Inc., Canadá) e SFB (10%), constituiu o grupo controle. O meio BARC foi constituído pelos mesmos componentes do grupo controle, contudo, foi acrescido de diferentes concentrações de SFB, BSA ou PVA, como se segue: exp.1: SFB foi adicionado ao meio BARC nas concentrações de 0, 5 e 10%; exp. 2: BSA foi adicionada ao meio BARC nas concentrações de 0, 4 e 8 mg/mL; exp. 3: PVA foi adicionado ao meio BARC nas concentrações de 0, 0,5 e

1 mg/mL. A incubação foi conduzida em estufa de cultura (Forma Scientific, USA), em atmosfera úmida, a 5% CO₂, em ar, a 38,7 °C, por 24 horas.

Preparação do sêmen e fertilização *in vitro* (FIV)

Para a seleção espermática foi utilizada a técnica de gradiente de Percoll (Nutricell, Campinas, Brasil). Desta forma, em tubo de centrifuga de 15 mL foi adicionado o volume de 1 mL de Percoll a 45% e, em seguida, no fundo do tubo, 1 mL de Percoll a 90%, sendo então, colocado em estufa de CO₂, por 2 horas. Após esse período, uma palheta de sêmen, de um único touro da raça Simental, foi descongelada em água a 37 °C, por 30 segundos; em seguida, 400 µL do sêmen foram depositados sobre a solução de Percoll a 45% e o tubo centrifugado a 700x g, por 20 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, os espermatozoides re-suspendidos em 3 mL de meio TALP e centrifugados (250x g), por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento diluído em 50 µL de meio FIV (TALP + PHE + heparina). Posteriormente, foi realizada a contagem espermática em câmara de Neubauer, bem como avaliada a motilidade e o vigor. Grupos de 20 oócitos foram coíncubados com espermatozóides (concentração final de 2,0 x 10⁶/mL x motilidade), em gotas de meio FIV, sob óleo mineral, em atmosfera úmida a 5% de CO₂, em ar, a 38,7 °C, por 20 horas.

Cultura *in vitro* (CIV)

Ao término da etapa de inseminação, as células do *cumulus* foram parcialmente removidas, por pipetagens sucessivas, e os prováveis zigotos transferidos para gotas (100 µL) de meio de cultura SOF-m (modificado). Decorridas 72 horas pós-inseminação (hpi), a clivagem foi verificada e 50% do meio de cultura foi substituído por meio fresco, sendo o procedimento repetido novamente às 120 hpi. A etapa de cultura (CIV) também foi realizada sob as mesmas condições de atmosfera descritas para MIV e FIV. O desenvolvimento embrionário foi monitorado, a fim de se avaliar os oócitos maturados que fertilizaram (72 hpi) e alcançaram os diferentes estágios de blastocisto às 168 hpi, respectivamente.

Análise estatística

Os experimentos foram repetidos cinco vezes (mínimo de 70 oócitos/grupo), sendo os dados analisados pelo "software" (SAS/STAT). ANOVA foi aplicada para avaliar diferenças estatísticas e o teste *t* de Bonferroni para determinar diferenças entre os grupos. Cada estágio de desenvolvimento foi tomado como a proporção de oócitos maturados chegando aos estágios indicados, registrado, também, em porcentagem. Diferenças de P<0,05 foram consideradas significativas.

RESULTADOS

A taxa de clivagem e a produção de blastocistos foram avaliadas, após a maturação *in vitro* de oócitos em meio BARC, suplementado com diferentes concentrações de SFB, BSA ou PVA, em comparação com o grupo controle (TCM + SFB). Os resultados obtidos no experimento 1 são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Influência de diferentes concentrações de SFB, adicionadas ao meio BARC de maturação de oócitos bovinos, em comparação com o meio TCM suplementado com 10% de SFB, sobre o subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Grupos	n	Desenvolvimento embrionário (% de oócitos)	
		C	B/Bx/Be
		72 h*	168 h**
TCM + SFB	71	62 (87,3) ^a	35 (49,3) ^a
BARC + SFB 0%	73	54 (74,0) ^b	03 (4,1) ^c
BARC + SFB 5%	71	51 (71,8) ^b	08 (11,3) ^b
BARC + SFB 10%	71	54 (76,0) ^b	14 (19,7) ^b

^{a,b,c} Diferentes letras na coluna denotam diferença significativa (P<0,05).

*Clivagem

** B (Blastocisto), Bx (Blastocisto expandido), Be (Blastocisto em eclosão).

Uma maior clivagem (87,3%), P<0,05) foi observada no grupo TCM + SFB do que nos grupos tendo o BARC como meio base; porém, resultados similares foram obtidos entre os tratamentos com BARC a 0 (74,0%), 5 (71,8%) ou 10% (76,0%) de SFB. Diferença significativa foi constatada entre os grupos para o número de blastocistos, sendo que o grupo TCM + SFB produziu maior porcentagem de embriões (49,3%) em comparação com os grupos com 0 (4,1%), 5 (11,3%) e 10% (19,7%) de SFB em meio BARC. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos 5 e 10%, contudo, os resultados foram superiores aos obtidos no grupo com 0% de SFB. Na Tabela 2 são apresentados os resultados observados no experimento 2.

Tabela 2. Influência de diferentes concentrações de BSA, adicionadas ao meio BARC de maturação de oócitos bovinos, em comparação com o meio TCM suplementado com 10% de SFB, sobre o subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Grupos	n	Desenvolvimento embrionário (% de oócitos)	
		C	B/Bx/Be
		72 h*	168 h
TCM + SFB	70	66 (94,3) ^a	36 (51,4) ^a
BARC + BSA 0 mg/mL	72	47 (65,3) ^b	01 (1,4) ^b
BARC + BSA 4 mg/mL	84	56 (66,7) ^b	02 (2,4) ^b
BARC + BSA 8 mg/mL	72	54 (75,0) ^b	04 (5,6) ^b

^{a,b} Diferentes letras na coluna denotam diferença significativa (P<0,05).

*Clivagem

** B (Blastocisto), Bx (Blastocisto expandido), Be (Blastocisto em eclosão).

Maior taxa de fertilização (P<0,05) foi observada no meio TCM suplementado com 10% de SFB do que nos grupos de tratamento com BARC, independentemente da concentração de BSA, com resultados similares entre os grupos com 0 (65,3%), 4 (66,7%) e 8 (75,0%) mg/mL de BSA. Da mesma forma, maior porcentagem de blastocistos (P<0,05) foi obtida no grupo TCM + SFB em comparação com os tratamentos em meio BARC, sem diferença significativa entre esses. Os dados do experimento 3 acham-se sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Influência de diferentes concentrações de PVA, adicionadas ao meio BARC de maturação de oócitos bovinos, em comparação com o meio TCM suplementado com 10% de SFB, sobre o subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Grupos	n	Desenvolvimento embrionário (% de oócitos)	
		C	B/Bx/Be
		72 h*	168 h
TCM + SFB	76	69 (90,8) ^a	36 (47,4) ^a
BARC + PVA 0 mg/mL	73	55 (75,3) ^b	06 (8,2) ^b
BARC + PVA 0,5 mg/mL	94	74 (78,7) ^b	10 (10,6) ^b
BARC + PVA 1 mg/mL	70	60 (85,7) ^a	04 (5,7) ^b

^{a,b} Diferentes letras na coluna denotam diferença significativa (P<0,05).

*Clivagem

** B (Blastocisto), Bx (Blastocisto expandido), Be (Blastocisto em eclosão).

Não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento com TCM + SFB e BARC (1 mg/mL de PVA) para as porcentagens de oócitos que clivaram, contudo, estes grupos produziram uma maior porcentagem de oócitos fertilizados (P<0,05) às 72hpi do que os grupos 0 e 0,5 mg/mL de PVA. Em relação ao número de blastocistos, o resultado observado no grupo TCM + SFB foi superior (P<0,05) aos observados nos grupos de tratamento com PVA, porém, nenhuma diferença estatística foi constatada entre os tratamentos com diferentes concentrações de PVA.

DISCUSSÃO

Sendo o processo de maturação de oócitos *in vitro* uma etapa crucial na PIV de embriões, é de se esperar que, quanto mais apropriado for o meio de maturação, simulando o ambiente folicular e/ou tubárico, maior será a probabilidade de sucesso na etapa de fertilização e, conseqüentemente, na de formação de blastocistos. Desta forma, este estudo verificou os efeitos do meio BARC, comumente utilizado para cultura de embriões clonados, suplementado com SFB, BSA ou PVA, sobre a MIV de oócitos bovinos.

Embora os resultados de clivagem e de produção de blastocistos tenham sido muito baixos com o emprego do meio BARC, este é o primeiro relato da utilização desse meio de cultura para a MIV de oócitos de bovinos. Por outro lado, o meio controle (TCM + SFB) mostrou-se eficiente, como evidenciado pelos resultados obtidos, em comparação com aqueles verificados com a utilização de meio BARC, independentemente da macromolécula adicionada. Interessante que, a composição do meio BARC é similar à composição do meio SOF, o qual tem sido utilizado para a MIV de oócitos bovinos. Diferem basicamente pela presença de alguns aminoácidos (glicina, alanina e taurina) e sorbitol no meio BARC.

Como não existe menção na literatura sobre a utilização do meio BARC na MIV de oócitos, a comparação dos dados ficou prejudicada. Contudo, no presente estudo, quando o meio BARC foi comparado com o meio TCM + SFB, diferença significativa foi observada em favor do meio TCM tanto na taxa de fertilização quanto na formação de blastocistos aos diferentes estágios de desenvolvimento.

O meio SOF tem sido utilizado para a MIV de oócitos bovinos, Gandhi et al. (30) obtiveram resultados similares na produção de embriões, quando utilizaram os meios de cultura SOF + BSA (39,3%), SOF + SFB (31,8%) e TCM + SFB (47,4%) para a MIV de oócitos. Porém, observaram um menor número de células nos blastocistos produzidos em meio SOF + BSA, em comparação com o grupo SOF + SFB, além de uma menor expansão das células do *cumulus*. Watson et al. (31) demonstraram que o meio cSOFMaa (cSOFM +

“single-strength essential” [EAA] e “non essential [NEA] aminoacids”) não é somente eficaz para a cultura de embrião, mas, também, pode ser efetivamente usado como meio base para a MIV de oócitos bovinos, quando comparado com os meios TCM 199 + 10% de “newborn calf serum” (NCS), cSOFM + 10% NCS e cSOFM.

Nossos resultados de produção de blastocistos, obtidos com o emprego de meio BARC, acrescido de BSA ou PVA, em diferentes concentrações, também foram inferiores ao observados para o meio TCM + SFB. Contudo, Ali e Sirard (32), comparando diferentes suplementos proteicos (BSA-V, BSA purificado, BSA-FAF, albumina de ovo de galinha e SFB), além de duas macromoléculas sintéticas (PVA e PVP-40 e PVP-360), adicionados ao meio SOF, verificaram que a presença de PVP-40 (8 mg/mL), durante a MIV de oócitos bovinos, aumentou significativamente a produção de mórula e blastocisto. Contudo, em nosso estudo, a taxa de fertilização de oócitos em meio TCM + SFB foi similar à observada para o meio BARC com 1 mg/mL de PVA. Tal achado está em concordância aos relatados por Ali e Sirard (32). O efeito benéfico de moléculas não proteicas, sintéticas, como o PVA, não está bem definido, porém, parece ser decorrente de uma ação direta sobre a membrana do oócito (17). Da mesma forma, efeito positivo com a utilização de BSA-FAF (8 mg/mL) no meio base SOF, para MIV, foi relatada por Furnus et al. (33), em contraste com os resultados obtidos no presente estudo com o meio TCM.

Todavia, o BSA possui como contaminante embriotrófico o citrato (34), atuando também como agente quelante de metais (35), podendo estar contaminado com diversos peptídeos, substratos energéticos e fatores de crescimento (36). Além disso, diferentes partidas de BSA, disponíveis comercialmente, podem inibir ou estimular o desenvolvimento embrionário (37). O BSA tem sido comumente substituído por macromoléculas sintéticas, PVA ou PVP, quando meios quimicamente definidos são desejados (38).

Assim, uma baixa competência para o desenvolvimento embrionário, quando o meio BARC foi utilizado, sugere que o mesmo não foi efetivo em promover uma completa maturação citoplasmática do oócito, implicando em menor taxa de fertilização e baixa produção de blastocistos. Tais achados podem ser decorrentes de uma ineficiente síntese de mRNAs e/ou proteínas necessárias para o metabolismo dos oócitos antes da ativação do genoma embrionário. Durante a maturação, as mitocôndrias estão sintetizando ATP para estimular a síntese proteica necessária para a maturação do oócito e, posterior, desenvolvimento do embrião (2). Este fato também foi relatado por Yurttas, Morency e Coonrod (10), os quais observaram que oócitos transcrevem e estocam uma grande quantidade de material não seletivo para a oogênese, mas, que são essenciais na regulação da embriogênese.

Seguramente, a utilização de meio quimicamente definido (MQD) na etapa da MIV seria fundamental para a identificação de componentes essenciais para o estabelecimento da maturação citoplasmática e nuclear, a qual poderia culminar com o desenvolvimento de um maior número de oócitos fertilizados e blastocistos produzidos. Porém, desde o primeiro relato de sucesso da produção de embriões bovinos em MQD (29), poucos trabalhos têm priorizado a adoção de protocolos visando a PIV de embriões nesses meios, o que torna mais difícil a elucidação de constituintes essenciais para os gametas e embriões em cultura *in vitro*.

Esses autores demonstraram a habilidade das gonadotrofinas recombinantes (r-hFSH e r-hLH) efetivamente levar à maturação funcional de oócitos bovinos, evidenciada pelo desenvolvimento embrionário comparável com o meio de MIV contendo gonadotrofinas biológicas (oFSH, NIDDK-o-FSH-17; b-LH, USDA-bLH-B-6). Entretanto, a maioria dos pesquisadores ainda trabalha com gonadotrofinas biológicas, purificadas (38-41).

Devido ao fato de o meio BARC não ter se mostrado efetivo para a MIV de oócitos bovinos, sob as condições experimentais adotadas neste estudo, investigações adicionais, com a adição de diferentes componentes quimicamente definidos ao meio BARC, devem ser

realizadas na expectativa de aprimorar a MIV de oócitos bovinos, visando, assim, a obtenção de oócitos com maior competência para a FIV e maior capacidade para o desenvolvimento embrionário até os estágios de pré-implantação.

CONCLUSÃO

O meio BARC, suplementado com diferentes concentrações de SFB, BSA ou PVA, não foi eficiente em promover adequada maturação de oócitos bovinos *in vitro*, resultando em menor taxa de fertilização e baixa produção de blastocistos, em comparação com o meio TCM.

AGRADECIMENTOS

FAPESP (processo n°. 2011/11985-2) e frigorífico BrasFrigo, Birigui, SP.

REFERÊNCIAS

1. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in cow. *Biol Reprod.* 1982;27:47-158.
2. Krisher RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology.* 1998;49:103-14.
3. Gilchrist RB, Albuz FK, Thompson JG. A new approach to in vitro maturation (IVM) and embryo in vitro production: induced IVM substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Reprod Fertil Dev.* 2010;22:293.
4. Van Blerhom J, Bell H, Weipz D. Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization, and preimplantation embryogenesis in vitro. *J Electron Microscop Tech.* 1990;16:298-323.
5. Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction.* 2010;139:685-95.
6. Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB, Thompson JG. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction.* 2003;126:27-34.
7. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:431-46.
8. Bender K, Walsh S, Evans ACO, Fair T, Brennan L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. *Reproduction.* 2010;139:1047-55.
9. Gendelman M, Aroyo A, Yavin S, Roth Z. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction.* 2010;140:73-82.

10. Yurttas P, Morency E, Coonrod SA. Use of proteomics to identify highly abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. *Reproduction*. 2010;139:809-23.
11. Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*. 2002;57:2105-17.
12. Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod*. 2002;66:38-43.
13. Pereira DC, Dode MAN, Rumpf R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. 2005;63:1131-41.
14. Silvestre MA, Yániz J, Salvador I, Santolaria P, López-Gatius F. Vitrification of pre-pubertal ovine cumulus-oocytes complexes: effect of cytochalasin B pretreatment. *Anim Reprod Sci*. 2006;93:176-82.
15. Gonçalves RF, Chapman DA, Bertolla RP, Eder I, Killian GJ. Pre-treatment of cattle semen or oocytes with purified milk osteospondin affects in vitro fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci*. 2008;108:375-83.
16. Silva C, Calegari RS, Martins Jr A. Desenvolvimento de embriões bovinos após maturação in vitro de oócitos em meio de cultivo suplementado com taurina ou glicina. *Vet Zootec*. 2009;16:89-100.
17. Silva-Frade C, Martins Jr A, Borsanelli AC, Frade MC, Cardoso TC. Effects of bovine herpesvirus type 5 on development of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 2010;73:324-31.
18. Martins Jr A, Silva-Frade C, Borsanelli AC, Souza DG, Cardoso TC. Detection of viral DNA in bovine embryos after in vitro maturation of oocytes in herpesvirus type-5-containing medium. *Reprod Domest Anim*. 2010;45:98.
19. Makarevich AV, Markula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol Reprod*. 2002;66:386-92.
20. Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod*. 2000;63:1730-4.
21. Olson SE, Seidel Jr GE. Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium. *J Anim Sci*. 2008;78:152-7.
22. Wrenzycki C, Hermann D, Keskinetepe L, M Martins Jr A, Sirissathien S, Brackett B, et al. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod*. 2001;16:893-901.

23. Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Imai H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. *Biol Reprod.* 2002;66:1696-701.
24. Silva-Frade C, Gameiro R, Martins Jr A, Cardoso TC. Apoptotic and developmental effects of bovine Herpesvirus type 5 infection on in vitro- produced bovine embryos. *Theriogenology.* 2010;74:1296-303.
25. Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respass D, et al. Enhanced survivability of cloned derived from roscovitine-treated adult somatics cells. *Biol Reprod.* 2002;66:895-900.
26. Martins Jr A, Silva RB, Zanon JEO, Calegari RS, Verona D. Beneficial effect of bovine embryos. *Biol Reprod.* 2003;68:338-9.
27. Paschoal DM, Calegari RS, Martins Jr A. Development of bovine embryos by using penicillin-containing culture medium. *Biol Reprod.* 2006;74:126-7.
28. Ferro AC, Silva C, Calegari RS, Crespilho AM, Martins Jr A. Produção de embriões in vitro em meio de cultura com ácido ascórbico. *Vet Zootec.* 2009;16:80-8.
29. Martins Jr A, Keskinetepe L, Brackett BG. Use of recombinant gonadotrophins for embryo production in vitro. *Theriogenology.* 1998;49:292.
30. Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum Reprod.* 2000;15:395-401.
31. Watson AJ, Souza P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquart J, et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod.* 2000;62:355-64.
32. Ali A, Sirard MA. Effects of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod.* 2002;66:901-5.
33. Furnus CC, Matos DG, Picco S, García PP, Inda AM, Matioli G, et al. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattles oocytes. *Anim Reprod Sci.* 2008;109:88-99.
34. Gray CW, Morgan PM, Kane MT. Purification of an embryotrophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate. *J Reprod Fertil.* 1992;94:471-80.
35. Chenberk S, Martell AE. Organic sequestering agents. New York: JohnWiley and Sons; 1959.
36. Kane MT. A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion in vitro. *J Reprod Fertil.* 1985;73:147-50.

37. Pinyopummintr T, Bavister BD. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*. 1994;41:1241-9.
38. Keskintepe L, Burneley CA, Brackett BG. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biol Reprod*. 1995;52:1410-7.
39. Keskintepe L, Brackett BG. In vitro development competence of in vitro matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod*. 1996;55:333-9.
40. Martins Jr A, Brackett BG. Bovine blastocyst development in chemically defined media after in vitro maturation with low concentration of recombinant human FSH. *Rev Bras Reprod Anim*. 2003;27:398-400.
41. Martins Jr A, Calegari RS, Paschoal DM, Koivisto MB, Ferro AC. Development of bovine in vitro-produced embryos after oocyte maturation with recombinant gonadotrophins and IGF 1 in chemically defined conditions. *Biol Reprod*. 2004;71:245.

Recebido em: 29/08/2012

Aceito em: 08/11/2013

INFEÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* EM ANIMAIS SILVESTRES PROCEDENTES DE ZOOLOGICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO

Carolina Ballarin Zetun¹
Simone Baldini Lucheis²
Marcella Zampoli Troncarelli³
Helio Langoni⁴

RESUMO

A doença de Chagas (ou Tripanossomíase Americana) é uma zoonose de caráter crônico, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). No ciclo silvestre, insetos triatomíneos são importantes vetores, podendo infectar roedores, marsupiais e outros animais silvestres, que constituem os reservatórios do parasito. Devido à intensa destruição do ambiente natural onde vivem os animais, estes estão sendo forçados a mudar de habitat. Os insetos vetores têm se adaptado a fontes alternativas de alimento, tanto no peridomicílio, como no intradomicílio, condições que podem determinar o aumento da incidência da doença em humanos. Considerando a importância dos animais silvestres como reservatórios de *T. cruzi*, o objetivo do presente estudo foi avaliar, por hemocultura e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a infecção natural em alguns animais silvestres de três zoológicos do Estado de São Paulo. Foram colhidas amostras de sangue de três cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), de três quatis (*Nasua nasua*), de um gambá (*Didelphis marsupialis*), de uma jaguatirica (*Felis pardalis*), de um veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), de cinco tatus-galinha (*Dasytus novemcinctus*), e de um tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). Somente duas das três amostras de sangue dos cachorros-do-mato foram positivas pela hemocultura e pela PCR, entretanto uma das amostras que foi negativa na hemocultura foi positiva pela PCR. Estes resultados demonstram a importância do cachorro-do-mato como reservatório de *T. cruzi*, no ciclo epidemiológico da doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, hemocultura, PCR, animais silvestres, zoológico

Trypanosoma cruzi INFECTION IN ZOO WILD ANIMALS FROM SAO PAULO STATE, BRAZIL

ABSTRACT

Chagas disease (or American Trypanosomiasis) is an essentially chronic zoonosis caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) protozoa. In the wild cycle, wild Triatominea insects are important vectors. They can transmit the protozoa to rodents, marsupials and to other wild animals, which are important reservoirs. Due the increasing destruction of the wild animals' natural environment, they are being forced to change its habitat. Moreover, the disease-vector insects can become adapted to different food alternatives in next-domiciliary and/or intradomiciliary areas. All these conditions can determine the increase of human disease's incidence. Considering the importance of wild animals as *T. cruzi* reservoirs, the objective of this study was to evaluate by hemoculture and PCR, the *Trypanosoma* natural infection in

¹ Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP-Botucatu-SP.

² Pesquisadora Científica da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA Centro-Oeste, Unidade de Pesquisa de Bauru

³ Pós-doutoranda em Saúde Animal, Saúde Pública e Segurança Alimentar, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP-Botucatu-SP. Contato para correspondência.

⁴ Professor Titular, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP-Botucatu-SP

some wild animals collected from three zoos in Sao Paulo state. It was collected blood samples from three Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*), three Coati (*Nasua nasua*), one Opossum (*Didelphis marsupialis*), one Ocelot (*Felis pardalis*), one Grey-Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*), five Nine-Banded Armadillo (*Dasypus novemcinctus*), and one wild-life Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). Two of three blood samples of Crab-eating fox were both positive by hemoculture and PCR. However, one negative sample by hemoculture was positive by PCR. Results show the importance of the Crab-eating fox as *T. cruzi* reservoir and its epidemiological importance in the Chagas' disease cycle.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, hemoculture, PCR, wild animals, zoo

INFECCION POR *Trypanosoma cruzi* EN ANIMALES SILVESTRES DE ZOOLOGICOS DE SAO PAULO, BRASIL

RESUMEN

La enfermedad de Chagas (o Tripanosomiasis Americana) es una zoonosis de carácter crónico, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). En el ciclo silvestre, los insectos triatomíneos son importantes vectores, y pueden infectar roedores, marsupiales y otros animales silvestres, que constituyen los reservorios del parásito. Debido a la intensa destrucción del ambiente natural donde viven los animales, estos están siendo forzados a cambiar de hábitat. Los insectos vectores han se adaptado a fuentes alternativas de alimento, tanto en el peridomicilio, como en el intradomicilio, condiciones que pueden determinar el aumento de la incidencia de la enfermedad en humanos. Considerando la importancia de los animales silvestres como reservorios de *T. cruzi*, el objetivo del presente estudio fue evaluar, por hemocultura y Reacción en Cadena por la Polimerase (PCR), la infección natural en algunos animales silvestres de tres zoológicos del Estado de Sao Paulo. Fueron colectadas muestras de sangre de tres grisons (*Cerdocyon thous*), tres coatis (*Nasua nasua*), un gamba (*Didelphis marsupialis*), una jaguatirica (*Felis pardalis*), un ciervo (*Mazama gouazoubira*), cinco tatús (*Dasypus novemcinctus*), y un oso hormiguero (*Myrmecophaga tridactyla*). Solamente dos de las tres muestras de sangre de los grisons fueron positivas por la hemocultura y por la PCR, entretanto una de las muestras que fue negativa en la hemocultura fue positiva por la PCR. Estos resultados muestran la importancia del grison como reservorio de *T. cruzi*, en el ciclo epidemiológico de la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, hemocultura, PCR, animales silvestres, zoológico

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, ou Tripanosomíase Americana é uma zoonose de caráter crônico, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Apresenta grande importância em saúde pública pela sua elevada frequência e ampla distribuição na América Latina, com diferentes padrões de morbi-mortalidade (1). A população em risco de contrair esta enfermidade nas Américas é superior a 100 milhões de habitantes, dos quais fundamentalmente habitam áreas rurais e suburbanas, desenvolvendo atividades agrícolas ou pecuárias, na maioria dos casos, com grandes restrições econômicas (2). Além das mortes precoces em populações adultas, gera perdas na produtividade pelo absenteísmo, resultando em custo médico-social elevado, representado por tratamentos, internações hospitalares, cirurgias corretivas, utilização de marcapassos, entre outros.

A transmissão de *T. cruzi* usualmente envolve contato com as fezes de um inseto vetor (normalmente do Gênero *Triatoma*) ou sangue contendo parasitos viáveis (transmissão

natural), e ainda por transfusões sanguíneas, transmissão congênita, transplante de órgãos, auto-inoculação em atividades laboratoriais, via oral (amamentação, alimentos contaminados com fezes ou urina de triatomíneos infectados; ou ingestão de triatomíneos infectados e canibalismo entre diferentes espécies animais) (3).

Há três ciclos de transmissão vetorial do *T. cruzi*, sendo o de maior importância epidemiológica o ciclo doméstico, entre seres humanos, que constituem os principais reservatórios do parasita, além dos cães, gatos e, em alguns países, as cobaias. No ciclo silvestre, intervêm os triatomíneos que podem transmitir o parasito a roedores, marsupiais e outros animais silvestres. O terceiro ciclo é o peridoméstico, que envolve mamíferos (roedores domésticos, marsupiais, gatos e cães) que têm livre acesso às residências; além de triatomíneos silvestres, que são atraídos às casas, pela luz e alimento. Este ciclo atua como um elo entre os ciclos doméstico e silvestre (4).

No início da década de 90, intervenções de controle tiveram sucesso na maior parte da América Latina, conseguindo reduzir a incidência da doença de Chagas em 60% no Paraguai e em mais de 99% no Uruguai e Chile (4-6). No entanto, com o controle químico do *Triatoma infestans* presume-se o surgimento de um novo cenário de epidemiologia endêmica da doença de Chagas, causado pela crescente taxa de domiciliação de espécies silvestres e peridomésticas (7, 8).

Desde 1924, quando Chagas (9) confirmou a identificação do parasito encontrado em 1922 por Aben-Athar (10) em mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), no estado do Pará, como sendo *T. cruzi*, algumas espécies de mamíferos selvagens, incluindo marsupiais, quirópteros, roedores e primatas nativos da Amazônia, têm sido descritos por vários autores como carreadores deste parasito; parasitos similares ao *T. cruzi* ou parasitos do “tipo cruzi” (11-13). Mais de 200 espécies de mamíferos silvestres estão envolvidas no ciclo epidemiológico da doença, dentre elas *Cerdocion thous* (cachorro-do-mato), e também gambás do Gênero *Didelphis* (14).

No âmbito silvestre, numerosas espécies de mamíferos terrestres e arborícolas têm sido encontradas naturalmente infectadas pelo *T. cruzi* em todas as áreas endêmicas. Esta é uma relação aparentemente muito antiga que proporciona equilíbrio entre parasita e hospedeiro, sem dano para nenhuma espécie. Atenção especial é conferida aos reservatórios silvestres capazes de aproximarem-se do ser humano, especialmente alguns marsupiais (gambás, em geral) além de reservatórios sinantrópicos, tais como os roedores (15). A proximidade com o ciclo doméstico é facilitada pela grande mobilidade desses animais, sobretudo em condições resultantes da própria ação do homem, ao retirar-lhes a comida e o abrigo (ações extensivas sobre o meio natural, tais como araques, reflorestamentos e barragens) ou quando lhes proporciona comida e abrigo (coleta e armazenamento de grãos, criação de aves, construções rústicas, etc) (16-19). Esses animais não apenas levam o parasito para as cercanias do homem, mas também ajudam na dispersão dos triatomíneos que, freqüentemente, carregam em sua pelagem (20, 21).

Há um aumento progressivo na transmissão de doenças entre animais selvagens e domésticos e humanos. Mudanças ambientais influenciando essa transmissão podem ser de origem natural ou antropogênica, incluindo atividades de expansão, fragmentação de habitat, desmatamento, aquecimento climático e poluição. A emergência de doenças também envolve perda de biodiversidade e aumento na incidência de zoonoses (22, 23).

Os principais fatores responsáveis pelo aumento da abrangência de áreas endêmicas são: 1) O desmatamento incontrolado e colonização, alterando o balanço ecológico entre hospedeiros reservatórios e vetores selvagens; 2) A adaptação de hospedeiros reservatórios de *T. cruzi* e vetores selvagens em áreas periféricas e intra-domiciliares, como a única alternativa de alimentação; 3) A migração de populações humanas infectadas a partir de áreas endêmicas, acompanhadas de hospedeiros e reservatórios domésticos (cães e gatos), assim como o carregamento acidental na bagagem de vetores já adaptados ao habitat doméstico.

Considerando a possibilidade da atuação de animais silvestres como reservatórios de *T. cruzi*, o objetivo do presente estudo foi avaliar, por hemocultura e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a infecção natural pelo parasito em animais silvestres de três zoológicos do estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram examinadas, durante o período de agosto de 2004 a agosto de 2005, três amostras de sangue de cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*); três amostras de sangue de quatis (*Nasua nasua*) e uma amostra de sangue de gambá (*Didelphis marsupialis*), todos procedentes do Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, em Sorocaba-SP; uma amostra de sangue de jaguatirica (*Felis pardalis*) e uma amostra de sangue de veado catigueiro (*Mazama gouazoubira*), procedente do Zoológico do Município de São Bernardo do Campo; cinco amostras de sangue de tatus-galinha (*Dasypus novemcinctus*), procedentes do Instituto Lauro de Souza Lima, em Bauru-SP, e uma amostra sanguínea de um tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) de vida livre.

Os animais foram quimicamente contidos, com a administração de quetamina, xilasina ou tiletamina, de acordo com a dosagem recomendada para cada espécie animal. Foram colhidos 5 mL de sangue, por punção veno-jugular, utilizando-se tubos *vacutainer* contendo EDTA. As amostras foram imediatamente armazenadas sob refrigeração, em caixas de isopor, e transportadas ao laboratório para processamento.

Hemocultura

Para a realização da hemocultura, foram separados três tubos contendo 5mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) estéril. A manipulação das amostras de sangue foi realizada em capela de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool 70° e mantida sob a ação de luz ultravioleta, durante pelo menos 15 minutos. Com uma seringa estéril de 1mL, retirou-se a porção plasmática e transferiu-se lentamente para o primeiro tubo. Este procedimento foi repetido para a porção leucocitária (localizada entre o plasma e o sedimento de hemácias), a qual foi transferida para o segundo tubo e, igualmente para o sedimento de hemácias, o qual foi transferido para o terceiro tubo. As culturas foram mantidas em estufa a 28-30°C, por um período de até quatro meses após a inoculação, quando então foram submetidas à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa do DNA de *T. cruzi*.

Leitura das hemoculturas

Após dez dias de incubação, realizou-se a primeira leitura, em capela de fluxo laminar. Para tanto, retirou-se, com seringa e agulha estéreis, 5 mL do conteúdo de cada tubo de cultura inoculado, colocando-se entre lâmina e lamínula. Realizou-se a leitura de pelo menos cinco lâminas por tubo. A observação foi realizada em microscópio óptico, em aumento de 1000X, com óleo de imersão. As culturas foram observadas quinzenalmente, durante quatro meses. As culturas positivas foram imediatamente processadas para a extração do DNA parasitário. Após o término dos quatro meses de acompanhamento das leituras, as culturas negativas também foram processadas para PCR.

Extração do DNA de *Trypanosoma cruzi*

Tanto as culturas positivas quanto as negativas foram lavadas em Solução Salina Tamponada (PBS) estéril (pH 7,2) e centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi armazenado em microtubos estéreis, livres de DNAses e RNAses, sob congelamento (a -20°C), até o momento da extração do DNA (24).

Os procedimentos de extração de DNA e PCR foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico de Zoonoses, da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP.

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e após, homogeneizadas em vórtex durante 20 segundos. A suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por dez minutos. O sobrenadante de cada amostra foi utilizado para a extração do DNA, em volume de 250µL. Homogeneizou-se vigorosamente em vórtex com 250µL de solução tampão de extração (200mmol de cloreto de sódio, 20mmol de Tris, 50mmol de EDTA), 1mg/mL de proteinase K e 2% de sódio-dodecil-sulfato (SDS), em microtubo de 1,5mL. Em seguida, os microtubos foram incubados a 56°C por uma hora e homogeneizados de 15 em 15 minutos. Foram adicionados 500µL de fenol, homogeneizando-se vigorosamente em vórtex, centrifugando-se a 13.000g por três minutos. A seguir, 300µL da fase aquosa foram cuidadosamente transferidos para novo microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados 150µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, centrifugando-se a 13.000g por três minutos. Em seguida, foram transferidos 200µL da fase aquosa para novo microtubo de 1,5mL, adicionando-se então 36µL de acetato de sódio 2M e 472µL de etanol absoluto gelado, mantendo-se os microtubos a -80°C por duas horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13.000g durante 10 minutos, vertendo-se o etanol cuidadosamente e adicionando-se 470µL de etanol 70%. Os microtubos foram homogeneizados cuidadosamente e centrifugados a 13.000g durante 10 minutos, retirando-se o etanol. A seguir, os microtubos permaneceram abertos à temperatura ambiente para secagem. As amostras de DNA foram ressuspensas em 50µL de água ultra pura e armazenadas a -20°C até a realização da PCR.

PCR para pesquisa do DNA de *T.cruzi*

Cada tubo de reação de 0,2mL recebeu 5µL de tampão de PCR (50mmol KCl, 10mmol de Tris-HCl), 1,5 U de Taq-polimerase, 10pmol de cada oligonucleotídeo, 10µL da amostra a ser testada e 15,2µL de água ultra pura (MIX-PCR). Portanto, cada tubo continha 40µL do MIX-PCR e 10µL da amostra de DNA.

As condições de amplificação em termociclador (GeneAmp PCR System 9600) foram: um ciclo para desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos; desnaturação, anexação dos iniciadores e alongamento em 30 ciclos por um minuto cada a 94°C, 60°C e 72°C, respectivamente; e um ciclo de 72°C por dez minutos. Para amplificação dos fragmentos de minicírculos de kDNA, foram utilizados os iniciadores P35 (5' AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA 3') e P36 (5' GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT 3') (25).

Nesta reação, os produtos resultantes apresentam 330 pares de base (pb) de comprimento, correspondendo à amplificação do fragmento contendo uma região específica do minicírculo de kDNA do *T.cruzi* (26). A cepa Y do *T.cruzi* foi utilizada como controle positivo da reação, enquanto o TNE (Tris-NaCl-EDTA) e o MIX-PCR foram utilizados como controles negativos. Os produtos amplificados foram visualizados após a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Duas das três amostras de sangue de cachorros-do-mato foram positivas à hemocultura, revelando formas epimastigotas ativas. Estas amostras foram também positivas pela PCR para *T. cruzi*. A outra amostra de sangue de cachorro-do-mato, que havia sido negativa à hemocultura, foi positiva pela PCR, sugerindo resultado falso-negativo pela hemocultura. Como não havia dados disponíveis sobre a procedência destes animais (se capturados ou nascidos no zoológico), não foi possível estabelecer a origem da infecção. No entanto, estes resultados sugerem que os cachorros-do-mato, mesmo em cativeiro, podem estar suscetíveis à infecção por *T. cruzi*.

Em estudos realizados em parques nacionais, os três principais fatores que estão modulando o ciclo de transmissão do *T. cruzi* entre pequenos mamíferos, são: I) perda de biodiversidade; II) aumento da abundância de marsupiais; III) variação sazonal. Sugere-se que estes mesmos fatores devam influenciar a infecção pelo parasito em mamíferos de médio porte (como o cachorro-do-mato) e os de grande porte, em outras regiões do país (27).

No presente estudo, as amostras de sangue das demais espécies animais avaliadas foram negativas, tanto pela hemocultura, quanto pela PCR para *T. cruzi*. Estes resultados diferem dos verificados por Lainson et al. (12), que avaliaram 1.197 animais silvestres do Estado do Pará, para pesquisa de hemoflagelados. Parasitos semelhantes ao *T. cruzi* foram encontrados em 13 diferentes espécies, e foram particularmente comuns em uma variedade de marsupiais (*Didelphinae*), porcos-espinhos (*Coendou* spp), tatus (*Dasypus novemcinctus*) e quatis (*Nasua nasua*). Em outro estudo, realizado na Carolina do Norte, EUA, *T. cruzi* foi isolado em 1/12 (8,3%) gambás (*Didelphinae*) e 3/20 (15%) “raccons” (*Procyon lotor*) (28).

Por outro lado, a ausência de infecção em alguns animais silvestres também foi verificada por xenodiagnóstico em um total de 74 mamíferos selvagens pertencentes a onze espécies (29). Apesar da infecção pelo parasito ter sido detectada em 10/28 (35,7%) gambás (*Didelphis albiventris*), nenhum dos 46 mamíferos restantes (seis *Conepatus chinga*, um *Monodelphis dimidiata*, oito *Chaetophractus vellerosus*, três *Tolypeutes matacus*, sete *Oligoryzomys* spp., dois *Akodon* spp., dois *Callomys venustus*, um *Felis geoffroyi* e quinze *Desmodus rotundus*) estavam infectados.

A baixa taxa de infecção dos hospedeiros reservatórios colhidos pode ser um reflexo de uma reduzida densidade de triatomíneos nos locais de procedência dos animais, ou sugere que a infecção seja principalmente transmitida por canibalismo ou necrofagia. De toda maneira, devido ao reduzido número das demais espécies silvestres avaliadas, não foi possível descartar a possibilidade destas como possíveis reservatórios do parasito. Em um estudo com 141 animais do Parque Ecológico de “El Zapotal” no México, sendo 118 roedores (83,7% do total da amostra); 19 gambás (13,5%), e quatro morcegos (2,8%) (30), a infecção por *T. cruzi*, foi detectada por microscopia direta do sangue, xenodiagnóstico, hemocultura e exames histopatológicos. Treze animais foram positivos, representados por apenas três espécies: dois roedores, *Peromyscus mexicanus* (5/80, 6,3%) e *Heteromys desmaretianus* (6/34, 17,6%) e um gambá, *Didelphis virginiana* (2/12, 6,3%). Apesar do relato da presença de alguns triatomíneos, por moradores do parque, nenhum espécime foi encontrado na área.

Na Mata Atlântica Costeira verificou-se um distinto cenário enzoótico, em que o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) foi a espécie mais infectada (52%), em comparação com marsupiais (5,3%) e roedores (18%) (31). Todas as infecções em *L. rosalia* eram pela linhagem 1, enquanto os isolados de outros mamíferos pertenciam à linhagem 2, sugerindo que a dispersão de *T. cruzi* no ambiente silvestre pode ocorrer simultaneamente por ciclos de transmissão distintos e independentes, os quais estariam regulados por fatores ainda desconhecidos, que não incluem estrato florestal. Provavelmente, o ciclo de transmissão silvestre é muito mais complexo do que o assumido até o momento. Alguns tripanosomatídeos de mamíferos infectam inúmeros hospedeiros vertebrados e invertebrados,

circulando, portanto, por dezenas de diferentes espécies de insetos e mamíferos em ecótopos distintos. Conseqüentemente, os surtos da doença são influenciados por diversos fatores, tais como a presença de carreadores, reservatórios silvestres, concentração de animais, vetores infectados e reprodução dos triatomíneos, condições que sofrem a influência de características ambientais.

Especial atenção deve ser conferida a profissionais que mantêm contato frequente com animais silvestres, como médicos veterinários, biólogos, tratadores, entre outros, cujas atividades se concentram em locais como zoológicos e criatórios, onde há possibilidade de ocorrência de vetores da tripanossomíase.

CONCLUSÃO

A espécie *Cerdocyoun thous* (cachorro-do-mato), mesmo em cativeiro, está suscetível à infecção por *T.cruzi*, podendo desempenhar importante papel no ciclo epidemiológico da doença de Chagas.

AGRADECIMENTOS

Às direções e aos funcionários do Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba-SP), do Zoológico do Município de São Bernardo do Campo-SP, e do Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru-SP), pela autorização e auxílio na colheita de sangue dos animais.

REFERÊNCIAS

1. De Lima H, Carrero J, Rodriguez A, De Guglielmo Z, Rodríguez N. Trypanosomatidae de importancia en salud pública en animales silvestres y sinantrópicos en un area rural del município Tovar del estado Mérida, Venezuela. *Biomédica*. 2006;26:42-50.
2. World Health Organization. Second report of the WHO Expert Committee, Control of Chagas' disease. Geneva: WHO; 2002. p.55-63. Technical report series, 905.
3. Navin TR, Roberto RR, Juranek DD, Limpakarnjanarat K, Mortenson W, Clover JR, et al. Human and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in California. *Am J Public Health*. 1985;75:366-9.
4. World Health Organization. Control of Chagas' disease. Report of a WHO Exppert Committee. Geneva: WHO; 1991. Technical report series, 811.
5. Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:603-12.
6. World Health Organization. Common Technical Document. Chagas [Internet]. 2011 [cited 2011 Apr 12]. Available from: <http://www.who.int/ctd/chagas/epidemio.htm>
7. Silveira AC, Vinhaes MC, Lira E, Araújo E. O controle de *Triatoma brasilienses* e *Triatoma pseudomaculata*. Estudo do tempo de reposição das condições de transmissão da doença de Chagas por *T. brasilienses* e *T. pseudomaculata*, em áreas submetidas a tratamento químico domiciliar, e de variáveis ambientais relacionadas. Brasília: OPAS; 2001.

8. Silveira AC. O controle da doença de Chagas nos Países do Cone do Sul da América. Brasília: OPAS; 2002.
9. Chagas C. Infeccion naturelle chez des singes du Pará (*Chrysothrix scuireus*) par *Trypanosoma cruzi*. C R Seances Soc Biol Fil. 1924;90:873-6.
10. Aben-Athar J. Primeiro ano de funcionamento do Instituto Hygiene de Belém. In: Souza Araújo AC. A Prophylaxia Rural no Estado do Pará. Belém: Livraria Gillet; 1922. p.190.
11. Barretto MP. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* nas Américas. Rev Bras Malariol Doenças Trop. 1964;16:527-52.
12. Lainson R, Shaw JJ, Frahia H, Miles MA, Draper CC. Chagas' disease in the Amazon Basin. *T. cruzi* in silvatic animals, triatomine bugs and man in the State of Pará, north Brazil. Trans R Soc Med Hyg. 1979;73:193-204.
13. Rodrigues IRC, Souza AA, Valente SAA. Novo caso autóctone de doença de Chagas no Estado do Pará. In: Resumos do 9º Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia; 1985, Fortaleza. Fortaleza: SBP; 1985. p.22.
14. Marvulo MFV. Zoonoses. In: Zalmir ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL, editors. Tratado de animais selvagens - medicina veterinária. São Paulo: Roca; 2007. p.1250-6.
15. Martins AV. Epidemiologia. In: Cançado JR, editor. Doença de Chagas. Belo Horizonte: Imprensa Oficial; 1968. p.285-97.
16. Dias JCP, Borges-Dias R. Housing and the control of vector of human Chagas' disease in the State of Minas Gerais, Brazil. Bull Pan Am Health Organ. 1982;16:117-29.
17. Dias JCP. Rural resource development and its potential to introduce domestic vectors into new epidemiological situation. Rev Argent Microbiol. 1988;20:81-5.
18. Dias JCP. Epidemiology. In: Wendel S, Bresser Z, Camargo ME, Rassi A, editors. Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact an transfusion and clinical medicine. São Paulo: ISBT; 1992. p.49-80.
19. Briceño-León R. La casa enferma. Sociologia de la enfermedad de Chagas. Caracas: Ediciones Capriles; 1990.
20. Forattini OP. Biogeografia, origem e distribuição de triatomíneos no Brasil. Rev Saude Publica. 1980;14:265-99.
21. Schofield CJ. Triatominae: biology and control. London: Eurocommunica Publications; 1994.
22. Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. Int J Parasitol. 2000;1:1-11.
23. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. Acta Trop. 2001;78:103-16.

24. Da Silva AV, Langoni H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol.* 2001;97:199-207.
25. Sturm N, Degrave W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas's disease. *Mol Biochem Parasitol.* 1989;33:205-14.
26. Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Specie specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop.* 1999;72:203-12.
27. Vaz VC. Efeito da fragmentação florestal sobre o ciclo de transmissão silvestre do *Trypanosoma cruzi* entre pequenos mamíferos na Serra dos Órgãos, Teresópolis-RJ [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2006.
28. Karsten V, Davis C, Kuhn R. *Trypanosoma cruzi* in wild raccoons and opossums in North Carolina. *J Parasitol.* 1992;78:547-9.
29. Diosque P, Padila AM, Cimino RC, Cardozo RM, Negrette OS, Marco JD, et al. Chagas' disease in a rural area of Chaco Province, Argentina: Epidemiologic survey in humans, reservoirs and vectors. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71:590-3.
30. Sólis-Franco R, Romo-Zapata JA, Martínez-Ibarra JA. Wild reservoirs infected by *Trypanosoma cruzi* in the Ecological Park "El Zapotal", Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92:163-4.
31. Jansen AM, Pinho APS, Lisboa CV, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94:203-4.

Recebido em: 10/10/2012

Aceito em: 10/12/2013

UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES PERÍODOS DE FOTOESTIMULAÇÃO EM ÉGUAS ACÍCLICAS PARA O CONTROLE DA SAZONALIDADE REPRODUTIVA

Carlos Guilherme de Castro Schutzer¹
Hélène Lacerda de Resende¹
José Carlos de Figueiredo Pantoja²
Marco Antônio Alvarenga^{1*}

RESUMO

As éguas apresentam um período de atividade reprodutiva durante o verão e, no inverno, pouca atividade folicular (anestro). A fim de antecipar a fase reprodutiva, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes períodos de fotoestimulação sobre a ocorrência da primeira ovulação da estação de monta em éguas em anestro sazonal. O experimento foi conduzido durante as estações reprodutivas de 2009 e 2010, do dia 1 de junho ao dia 1 de agosto, para isso foram utilizadas 45 éguas mestiças, em anestro, entre quatro e 12 anos, em São Simão – SP, Brasil. Na ausência de corpo lúteo e folículos maiores de 20 mm, as éguas foram aleatoriamente separadas nos seguintes grupos: G1 – controle, sem estímulo com luz artificial (G1; n=15), G2 – estimulação com luz artificial por 35 dias (G2; n=15) e G3 – estimulação com luz artificial por 60 dias (G3; n=15). Utilizou-se o teste de Fisher para comparar a proporção de éguas que ovularam até os primeiros 60 dias do experimento entre os grupos de estudo. O método de Bonferroni foi usado para ajustar o nível α para comparações múltiplas. Curvas de sobrevivência e modelos de risco proporcional de Cox foram usados para comparar a taxa de ovulação entre os grupos de estudo (expressa estimando a razão dos riscos). Significância estatística foi definida como $P < 0,05$ ou $P < 0,02$ para o teste de Fisher com comparações múltiplas. A proporção de éguas que ovularam até 60 dias após o início do tratamento foi significativamente maior (84,6%) no grupo tratado com luz artificial por 60 dias, quando comparado ao grupo controle (15,4%, $P=0,001$). Houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado com luz artificial por 35 dias (61,5%, $P=0,041$), porém não houve diferença entre os grupos tratados por 35 e 60 dias ($P=0,378$). O tempo mediano de ovulação no grupo tratado com luz artificial por 60 dias foi 53 dias, enquanto éguas no grupo tratado com luz artificial por 35 ou éguas no grupo controle ovularam aos 56 e 125 dias, respectivamente. Conclui-se que a redução do tratamento com luz artificial para 35 dias não foi tão eficaz quanto o protocolo convencional de 60 dias.

Palavras-chave: anestro, éguas, fotoperíodo, sazonalidade, transição

USE OF DIFFERENT PERIODS OF PHOTOSTIMULATION IN ACYCLIC MARES FOR REPRODUCTIVE SEASONAL CONTROL

ABSTRACT

The mares have a period of reproductive activity during the summer and in winter, poor follicular activity (anestrous). In order to anticipate the reproductive phase, this study aimed to evaluate the effect of different periods of photic stimulation on the occurrence of first ovulation of the breeding season in mares in seasonal anestrous. The experiment was conducted during the breeding seasons of 2009 and 2010, from 1 July to 1 August, were used

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Campus de Botucatu. *correspondência.

² Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. FMVZ - UNESP - Botucatu

45 mares crossbred in anestrus between four and 12 years in São Simão - SP, Brazil. In the absence of the corpus luteum and follicles larger than 20 mm, mares were randomly separated into the following groups: G1 - control, without stimulation with artificial light (G1, n=15), G2 - stimulation with artificial light for 35 days (G2; n=15) and G3 - stimulation with artificial light for 60 days (G3, n=15). We used the Fisher exact test for analysis of ovulation rate to the first 60 days of the experiment and ANOVA followed by Tukey test to analyze the average number of days to first ovulation, all statistics were considered significant when $P < 0.05$. The Fisher test was used to compare the mare proportion that ovulated until the first 60 days of experiment between the study groups. The Bonferroni method was used to adjust the α level for multiple comparisons. Survival curves and Cox proportional hazards model were used to compare the ovulation rate between the study groups (estimating the expression of hazard ratio). Statistical significance was defined as $P < 0.05$ or $P < 0.02$ for the Fisher test with multiple comparisons. The proportion of mares that ovulated until 60 days after the beginning of the treatment was significantly larger (84.6%) in the group treated with artificial light by 60 days, when compared to the control group (15.4%, $P = 0.001$). There was statistical difference between the control group and the group treated with artificial light by 35 days (61.5%, $P = 0.041$), however was not statistical difference between the groups treated by 35 and 60 days ($P = 0.378$). The average ovulation time in the group treated with artificial light by 60 days was 53 days, while mares in the group treated with artificial light by 35 or mares in the control group ovulated at the 56 and 125 days, respectively. It is concluded that the reduction of treatment with artificial light for 35 days was not as effective as the conventional protocol of 60 days.

Keywords: anestrus, mares, photoperiod, seasonality, transition

UTILIZACIÓN DE DIFERENTES PERIODOS DE FOTOESTIMULACIÓN EN YEGUAS ACÍCLICAS PARA EL CONTROL DE LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA

RESUMEN

Las yeguas presentan el período de actividad reproductiva durante el verano y poca actividad folicular (anestro) durante el invierno. Con la intención de anticipar la temporada de monta, este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes períodos de fotoestimulación en la presentación de la primera ovulación de la temporada reproductiva. El experimento se llevó a cabo durante las temporadas reproductivas de 2009 y 2010, del 1 día del mes de junio al 1 de agosto, se utilizaron 45 yeguas mestizas, en anestro, de cuatro a 12 años, en São Simão/SP, Brasil. En la ausencia de cuerpo lúteo y de folículos mayores de 20 mm, las yeguas fueron separadas al azar en los siguientes grupos: Grupo 1- testigo, sin estímulo con luz artificial (G1, n=15), Grupo 2 - estimulación con luz artificial por 35 días (G2; n=15), y Grupo 3 - estimulación con luz artificial por 60 días (G3; n=15). Se utilizó el teste exacto de Fischer para la análisis del porcentaje de ovulación hasta los primeros 60 días del experimento y el ANOVA seguido del teste de Tukey para el análisis del número medio de días hasta la ovulación, todas las estadísticas se consideraron significativas cuando $P < 0,05$. Se utilizó la prueba de Fisher para comparar la proporción de yeguas que ovularon hasta los primeros 60 días del experimento entre los grupos de estudio. El método de Bonferroni fue utilizado para ajustar el nivel α para múltiples comparaciones. Las curvas de sobrevivencia y los modelos de riesgo proporcional de Cox fueron usados para comparar la tasa de ovulación entre los grupos de estudio (expresa la relación entre los riesgos estimados). La significancia estadística se definió como $P < 0,05$ o $P < 0,02$ para la prueba de Fisher con comparaciones múltiples. La proporción de yeguas que ovularon hasta 60 días después del inicio del tratamiento fue

Schutzer CGC, Resende HL, Pantoja JCF, Alvarenga MC. Utilização de diferentes períodos de fotoestimulação em éguas acíclicas para o controle da sazonalidade reprodutiva. Vet. e Zootec. 2014 mar.; 21(1): 148-153.

significativamente mayor (84,6%) en el grupo tratado con la luz artificial por 60 días, cuando son comparados con el grupo control (15,4%, $P=0,001$). Diferencia estadística entre los grupos control y el grupo tratado con la luz artificial por 35 días (61,5%, $P=0,041$), pero no hubo diferencia entre los grupos tratados por 35 y 60 días ($P=0,378$). El tiempo medio de la ovulación en el grupo tratado con luz artificial durante 60 días fue de 53 días, mientras que las yeguas en el grupo tratado con luz artificial por 35 o las yeguas en el grupo de control ovularon a los 56 y 125 días, respectivamente. Se concluye que la reducción del tratamiento con luz artificial para 35 días no fue tan eficiente cuanto el protocolo convencional de 60 días.

Palabras clave: Anestro, yeguas, fotoperiodo, estacionalidad, transición

INTRODUÇÃO

As éguas são classificadas como poliéstricas estacionais, pois possuem sua estação reprodutiva durante a primavera e verão. Três são os fatores básicos que explicam o caráter estacional dos ciclos estrais nas éguas: fotoperíodo, temperatura e nutrição (1).

A sazonalidade reprodutiva da égua tem importantes consequências para a criação comercial de equinos. Criadores que utilizam a técnica de transferência de embriões precisam adequar o manejo do período reprodutivo de doadoras ao calendário esportivo destes animais. Além disso, criadores, pertencentes às associações de raças adotam a idade hípica como critério de nivelamento de potros, assim procuram acasalar as éguas o mais cedo possível, para obter o nascimento dos potros o mais próximo possível à data oficial imposta para cavalos de *performance* (2).

Pesquisas sobre reprodução equina vêm buscando melhor entender e manipular os mecanismos que determinam sua sazonalidade reprodutiva. Para antecipação da primeira ovulação do ano, o método mais prático é a aplicação de fotoperíodo artificial, simulando dias longos (3).

O tratamento com iluminação diária de 16 horas utilizando luz artificial durante meados do inverno constitui um dos mais antigos e confiáveis métodos de indução da atividade ovariana no início da primavera (4). O tratamento tem duração média de 6 a 12 semanas, porém após duas semanas significativa atividade folicular pode ser observada (5). Guillaume et al. (6) conseguiram um tempo médio de 76 dias após o início do tratamento até a primeira ovulação para éguas tratadas (G1: 35 dias e G2: até primeira ovulação) e 131 dias para o grupo controle. Não houve diferença entre o grupo tratado por 35 dias e o grupo tratado por período prolongado. Devito et al. (7) trataram éguas em anestro por 35 e 60 dias, em um regime de 17 horas de luz (natural + artificial), os grupos tratados não apresentaram diferença ($P=0,188$) quanto ao tempo médio até primeira ovulação. No entanto, 90% dos animais tratados por 35 dias ovularam até 70 dias, contra 77,78% dos animais tratados por 60 dias. O grupo 1 ainda apresentou maior sincronização ($P=0,064$) no intervalo das ovulações.

A fim de adiantar a primeira ovulação da estação de monta e antecipar a fase reprodutiva das éguas, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes períodos de fotoestimulação sobre a ocorrência da primeira ovulação da estação de monta em éguas em anestro sazonal.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido durante as estações reprodutivas 2009 e 2010, do dia 1 de junho ao dia 1 de agosto, nas dependências da Embrio-Equi (Centro Avançado de Reprodução Equina), localizada no município de São Simão, São Paulo (Latitude $-21^{\circ} 28'45''$; Longitude $-47^{\circ} 33'03''$). Foram utilizadas 45 éguas sem raça definida, com idade entre 4 e 12 anos, com peso entre 400 e 500 kg.

Schutzer CGC, Resende HL, Pantoja JCF, Alvarenga MC. Utilização de diferentes períodos de fotoestimulação em éguas acíclicas para o controle da sazonalidade reprodutiva. Vet. e Zootec. 2014 mar.; 21(1): 148-153.

Previamente ao início do experimento, todas as éguas foram avaliadas por ultrassonografia trans-retal com o intuito de observar a condição uterina e ovariana, sendo critério para o estudo a ausência de corpo lúteo bem como de folículos maiores que 20 mm. Posteriormente a esta avaliação, os animais foram separados aleatoriamente aos grupos e monitorados duas vezes por semana. Quando detectado um folículo ≥ 35 mm de diâmetro, foi administrado 1500 UI de hCG (Vetecor[®], Laboratório Hertape Calier, MG, Brasil) segundo Gastal et al. (8) e 1 mg de acetato de deslorelina associadas, por via intramuscular, com objetivo de indução da ovulação e o monitoramento continuou sendo diário até a ovulação, avaliada pela presença de corpo lúteo. As avaliações foram realizadas utilizando um aparelho de ultrassonografia equipado com um transdutor linear de 5 MHz (Aloka SSD-500, Japão).

Após a seleção dos animais, os mesmos foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos: grupo 1 – controle, sem estímulo com luz artificial (G1; n=15), grupo 2 – estimulação com luz artificial por 35 dias (G2; n=15) e grupo 3 – estimulação com luz artificial por 60 dias (G3; n=15). Os grupos tratados foram estimulados por 35 dias (1 de junho a 5 de julho) ou 60 dias (1 de junho a 1 de agosto) de luz artificial, cada grupo de 15 animais foi confinado em um piquete de 100 m², com holofotes bem distribuídos, na tentativa de se evitar áreas de sombreamento. A intensidade utilizada foi de 80 lux de luz incandescente fria, permitindo a leitura confortável de um texto a 50 cm dos olhos, iniciando das 17 às 22 horas.

Na análise estatística o teste de Fisher foi utilizado para comparar a proporção de éguas que ovularam até os primeiros 60 dias do experimento entre os grupos de estudo. O método de Bonferroni foi usado para ajustar o nível α para comparações múltiplas. Curvas de sobrevivência (9) e modelos de risco proporcional de Cox (9) foram usados para comparar a taxa de ovulação entre os grupos de estudo (expressa estimando a razão dos riscos). Significância estatística foi definida como $P < 0,05$ ou $P < 0,02$ para o teste de Fisher com comparações múltiplas.

RESULTADOS

A proporção de éguas que ovularam até 60 dias após o início do tratamento foi significativamente maior (84,6%) no grupo tratado com luz artificial por 60 dias, quando comparado ao grupo controle (15,4%, $P=0,001$). Houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado com luz artificial por 35 dias (61,5%, $P=0,041$), porém não houve diferença estatística entre os grupos tratados por 35 e 60 dias ($P=0,378$).

O tempo mediano de ovulação no grupo tratado com luz artificial por 60 dias foi 53 dias, enquanto éguas no grupo tratado com luz artificial por 35 ou éguas no grupo controle ovularam aos 56 e 125 dias, respectivamente. Dessa forma, a taxa de ovulação (Figura 1) foi 8,7 (intervalo de confiança=1,9 – 40,0) vezes maior no grupo tratado com luz artificial por 60 dias, quando comparado ao grupo controle ($P=0,005$), e 5,3 (intervalo de confiança=1,1 – 25,0) vezes maior no grupo tratado com luz artificial por 35 dias quando comparado ao grupo controle ($P=0,035$).

Tabela 1. Média e desvio padrão de dias até a primeira ovulação em éguas tratadas com luz artificial com 80 lux de intensidade por diferentes períodos.

Grupos ¹	Tempo mediano (dias) até a 1 ^a ovulação	Mín.	Máx.
G1	125	51	154
G2	56	48	143
G3	53	48	136

¹ G1= Controle (n=13); G2= Luz artificial por 35 dias (n=13); G3= Luz artificial por 60 dias (n=13).

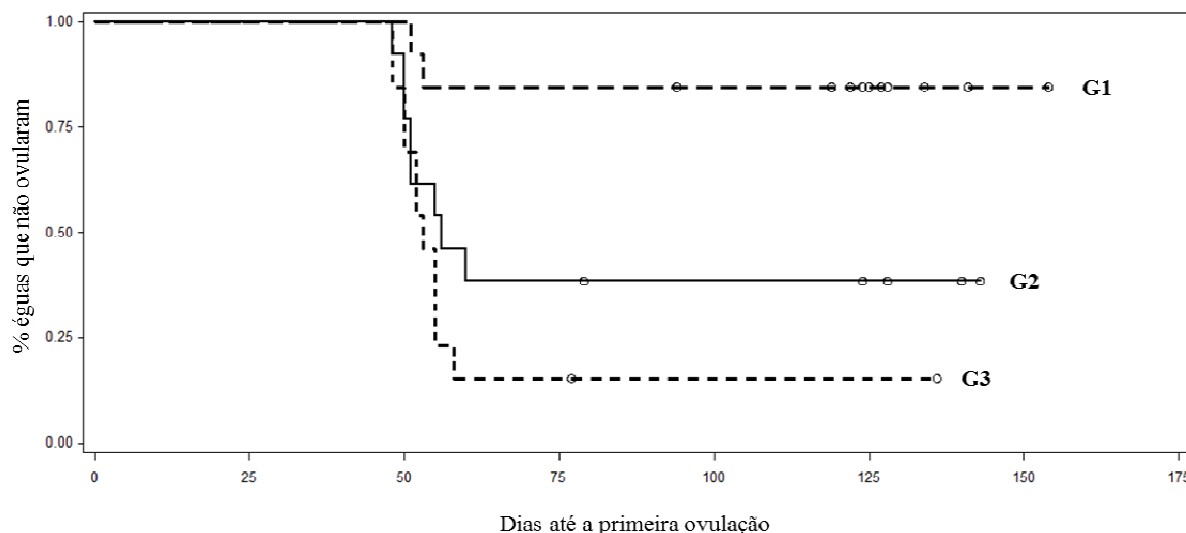


Figura 1. Taxa de ovulação entre os grupos estudados. G1= Controle (n=13); G2= Luz artificial por 35 dias (n=13); G3= Luz artificial por 60 dias (n=13).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, os protocolos propostos aceleraram o início da atividade cíclica ovariana em éguas em anestro criadas em condições subtropicais. Interessante é o fato de que este foi o segundo experimento controlado sobre o uso de luz artificial no Brasil, a despeito da utilização rotineira da luz artificial há mais de 50 anos em criatórios de equinos no Brasil, bem como a literatura é falha em relatar outros experimentos sobre o tema em éguas criadas na América do Sul.

Conforme esperado, o tratamento com adição de 5 horas de luz artificial durante 60 dias encurtou a fase de inatividade ovariana em aproximadamente 54 dias. Sendo este resultado mais longo que os achados por Devito et al. (7) com 49 dias em média até a primeira ovulação. Porém, mais curto que os achados por Guillaume et al. (6) com média de 76 dias até a primeira ovulação utilizando o tratamento com luz artificial por período prolongado.

O protocolo de encurtamento do tempo de luz artificial para 35 dias se mostrou tão eficiente quanto o tradicional (luz artificial por 60 dias) onde o percentual de éguas que ovularam até 60 dias diferiu do grupo controle, porém não houve diferença estatística entre o grupo tratado por 60 dias. Esses resultados discordam de Devito et al. (7), que observaram um percentual de éguas ovuladas até 70 dias superior no grupo tratado por 35 dias em relação ao grupo tratado por 60 dias com luz artificial (90% x 78%).

Acredita-se que essa diferença possa estar relacionada ao dia do início do tratamento, onde o presente estudo teve início dia 1 de junho e no trabalho de Devito et al. (7) o início foi em 21 de junho. Assim, os animais do experimento de Devito et al. (7) foram expostos à luz artificial durante os dias curtos por mais tempo (20 dias), enquanto no atual experimento a exposição das éguas à luz artificial durante 20 dias ocorreu quando os dias ainda eram considerados longos.

No que diz respeito ao tempo mediano para a ocorrência da primeira ovulação o protocolo com luz artificial por 35 dias se mostrou similar ao de luz artificial por 60 dias. Esses dados concordam com os experimentos de Guillaume et al. (6) e Devito et al. (7) que também verificaram uma antecipação na primeira ovulação da EM, no protocolo de 35 dias de luz artificial, com médias de 56 e 76 dias até a primeira ovulação da EM, respectivamente.

Um fato importante é que após a interrupção dos tratamentos todos os animais continuaram a apresentar ciclos ovulatórios.

CONCLUSÃO

Os resultados do experimento nos permitem concluir que a redução da fotoestimulação para 35 dias é tão eficaz quanto o protocolo convencional de 60 dias na antecipação da ciclicidade de éguas em fase de anestro sazonal.

Adicionalmente, pode-se concluir que os tratamentos com luz artificial por 35 ou 60 dias foram eficientes na antecipação da primeira ovulação da estação de monta, em éguas em fase de anestro sazonal, em condições subtropicais.

REFERÊNCIAS

1. Arruda RP. Manejo reprodutivo das fêmeas equinas. In: Anais da 13ª Semana de Zootecnia; 1990, Pirassununga. Campinas: Fundação Cargill; 1990.
2. Donadeu FX, Watson ED. Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. *Anim Reprod Sci.* 2007;100:225-42.
3. Ginther OJ. Reproductive biology of the mare. 2nd ed. Ann Arbor: McNaughton and Gunn Inc.; 1992.
4. Besonet B, Hansen B, Daels PF. Dopaminergic regulation of gonadotrophin secretion in seasonal anestrus mares. *J Reprod Fertil.* 1996;108:55-61.
5. Nagy P, Guillaume D, Daels P. Seasonality in mares. *Anim Reprod Sci.* 2000;60/61:245-62.
6. Guillaume D, Duchamp G, Nagy P, Palmer E. Determination of minimum light treatment required for photo stimulation of winter anoestrous mares. *J Reprod Fertil Suppl.* 2000;(56):205-16.
7. Devito LG, Carmo MT, Alvarenga MA, Santos JF, Oliveira JV. Effect of short of light exposure for the advance of ovarian activity of mares in se seasonal anestrus. *Acta Sci Vet.* 2006;34:347.
8. Gastal EL, Silva LA, Gastal MO, Evans MJ. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. *Anim Reprod Sci.* 2006;94:186-90.
9. SAS Institute. SAS/STAT 9.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 2009.

Recebido em: 03/02/2012

Aceito em: 31/01/2014

SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO POR HELMINTOS GASTRINTESTINAIS EM BOVINOS LEITEIROS DA MESORREGIÃO DO SUDOESTE PARANAENSE, BRASIL

Claudia Mello Ribeiro¹
Aristeu Vieira Da Silva²
Dirion Pinzon¹
Paulo Cesar Cassol¹
Emanuel Pizzi¹
Tiago Ribeiro Machado¹
Satie Katagiri³

RESUMO

Foram avaliados os aspectos epidemiológicos e a dinâmica das infecções por helmintos gastrintestinais em bovinos da Mesorregião do Sudoeste Paranaense. Amostras de fezes de 473 bovinos criados em sistema extensivo foram coletadas para a contagem de ovos de nematódeos por grama de fezes (OPG). Coproculturas foram realizadas com as amostras que continham ovos para obtenção e identificação de larvas infectantes. Os resultados foram analisados pelos testes de Qui-quadrado ou Exato de Fischer. Detectou-se a prevalência dos gêneros *Haemonchus*, *Cooperia*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia* e *Oesophagostomum*. As novilhas foram mais susceptíveis às infecções por nematódeos gastrintestinais em comparação com as vacas, sendo *Haemonchus*, *Cooperia* e *Ostertagia* os gêneros de parasitas mais prevalentes nestes animais.

Palavras-chave: epidemiologia, susceptibilidade, nematódeo, bovino

DAIRY CATTLE SUSCEPTIBLY TO GASTROINTESTINAL HELMINTH INFECTION IN THE MIDDLE REGION OF THE SOUTHWEST OF PARANA, BRAZIL

ABSTRACT

Epidemiological aspects and dynamics of gastrointestinal helminthes were evaluated in cattle from Parana Southwest Region. Stool samples from 473 animals raised in extensive system were collected and analyzed for nematode eggs per gram faeces (EPG). Faecal cultures were made with samples that contained eggs in order to identify third stage larvae. The results were analyzed by Chi-square or Fischer exact tests. The following genera were found: *Haemonchus*, *Cooperia*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia* and *Oesophagostomum*. The heifers were more susceptible to nematode gastrointestinal infections than the adult animals and *Haemonchus*, *Cooperia* and *Ostertagia* were the most common genera found in those animals.

Keywords: epidemiology, susceptibility, nematode, cattle

¹ União de Ensino do Sudoeste do Paraná

² Universidade Estadual de Feira de Santana

³ Universidade Federal de Sergipe

SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR HELMINTOS GASTROINTESTINALES EN BOVINOS LECHEROS DE LA MESOREGIÓN DEL SUDOESTE PARANAENSE, BRASIL

RESUMEN

Fueron evaluados los aspectos epidemiológicos y la dinámica de las infecciones por helmintos gastrointestinales de bovinos de la Mesoregión del Sudoeste Paranaense. Se tomaron muestras de heces de 473 bovinos criados bajo sistema extensivo para recuentos de huevos de nemátodos por gramo de heces (HPG). Se hicieron coprocultivos con las muestras que tenían huevos para obtención de larvas y su identificación. Los datos fueron analizados por medio del test Chi cuadrado o exacto de Fisher. Se detectó una prevalencia de los géneros *Haemonchus*, *Cooperia*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia* y *Oesophagostomum*. La media de conteo de huevos según categoría de hembras fué mayor para las novillas que en vacas. *Haemonchus*, *Cooperia* y *Ostertagia* son los géneros de parásitos más prevalentes en estos animales.

Palabras clave: epidemiología, susceptibilidad, nematodo, bovino

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, vários estudos têm demonstrado que as helmintoses gastrintestinais de bovinos causam queda significativa do índice de produtividade no rebanho leiteiro, principalmente quando se emprega o sistema de produção extensivo, onde os bovinos são criados em pastagens. As perdas econômicas decorrentes destas parasitoses ocorrem devido à redução na produção leiteira, às altas taxas de mortalidade e gastos com medicamentos anti-helmínticos. Entretanto, a administração destas drogas é realizada frequentemente sem critério, desconsiderando as variáveis regionais como clima e a dinâmica da infecção por nematódeos gastrintestinais (1-3). Portanto, a compreensão da epidemiologia das helmintoses é imprescindível para estabelecer medidas de controle eficazes que reduzam a contaminação das pastagens e diminuam os custos com anti-helmínticos (4). Não há relatos na literatura sobre a dinâmica de infecção por nematódeos em bovinos da Mesorregião do Sudoeste Paranaense; por isso, este estudo teve como objetivo obter informações sobre a epidemiologia destas helmintoses em bovinos criados em sistema extensivo, a fim de colaborar para a melhoria da produtividade dos rebanhos leiteiros.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Mesorregião do Sudoeste Paranaense, Paraná, Brasil (Figura 1) que apresenta clima subtropical (Cfa) com chuvas bem distribuídas durante o ano e verões quentes, com umidade relativa do ar de 65% e precipitação pluviométrica de 2.100 mm por ano (5).

No período de 18 de outubro de 2010 a 20 de maio de 2011, dezenove propriedades leiteiras com sistema extensivo de produção foram visitadas para coleta de amostras de fezes de 473 bovinos, incluindo vacas e novilhas. Quatrocentos e cinquenta e seis animais eram da raça holandesa e dezessete da raça girolanda. As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal com luvas de palpação, sendo acondicionadas na própria luva e mantidas sob refrigeração até o processamento. Em seguida, foram levadas ao Laboratório de Parasitologia Veterinária da Faculdade Educacional de Dois Vizinhos, Paraná, Brasil (25° 45' 0" S, 53° 3' 25" W). Foi realizada a contagem de ovos de nematódeos por grama de fezes (OPG), segundo a técnica de Gordon e Whitlock modificada (6). As amostras positivas para

Ribeiro CM. et al. Susceptibilidade à infecção por helmintos gastrintestinais em bovinos leiteiros da mesorregião do sudoeste paranaense, Brasil. Vet. e Zootec. 2014 mar.; 21(1): 154-159.

ovos foram submetidas à técnica de Roberts e O' Sullivan (7) para obtenção e identificação de larvas infectantes, segundo Ueno e Gonçalves (8). Para a análise dos dados foram utilizados os testes de Qui-quadrado ou Exato de Fischer.



Figura 1. Localização da Mesorregião do Sudoeste Paranaense no Estado do Paraná.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste experimento, a contagem de OPG foi usada como parâmetro para verificar a susceptibilidade de bovinos aos parasitas gastrintestinais. Estudos realizados em regiões tropicais indicaram que há uma significativa correlação entre valores de OPG e o número total de parasita dos hospedeiros, fazendo disso, uma medida confiável para estimar o grau de infecção (4). Neste estudo, constatou-se que as médias foram de 306 OPG para novilhas e 29 OPG para vacas. A frequência de positividade foi significativamente maior em novilhas do que em vacas (Tabela 1). Não houve influência do grupo genético na contagem de OPG ($p = 0,60$; O.R. = 1,08). De acordo estão Bricarello et al. (9), que demonstraram que bovinos resistentes aos nematódeos gastrintestinais apresentam valor médio de OPG inferior a 50, já os susceptíveis apresentam valor elevado de OPG. Em sistemas extensivos, os animais susceptíveis e que apresentam uma alta carga parasitária eliminam uma grande quantidade de ovos de nematódeos nas pastagens, expondo o rebanho aos parasitas.

Tabela 1. Frequência absoluta (N°) e frequência relativa (%) da associação entre a classe das fêmeas e os resultados do exame parasitológico de fezes bovinas.

	Negativo		Positivo		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%
Novilha	73	65	38	34,2	111	23,5
Vaca	310	85,6	52	14,4	362	76,5
Total	383	81	90	19	473	100

Pela coprocultura, detectou-se a prevalência dos gêneros *Haemonchus* (65,1%), *Trichostrongylus* (34,9%), *Ostertagia* (30,1%), *Cooperia* (21,75) e *Oesophagostomum* (3,6%). *Haemonchus* tem sido o nematódeo mais predominantemente encontrado em bovinos no Brasil (10, 11) e em outros países tropicais (12, 13). Além disso, verificou-se também que as novilhas apresentaram uma maior taxa de infecções múltiplas (58,1%) quando comparadas

às vacas (44%), e eram mais susceptíveis às parasitoses por *Haemonchus*, *Cooperia* e *Ostertagia* (Tabela 2).

Bricarello et al. (9) também observaram elevada prevalência de infecções por *Haemonchus* e *Cooperia* em bovinos e registraram correlação positiva entre o grau de infecção pelos diferentes gêneros de parasitas, isto é, os animais com maior susceptibilidade às infecções por *Haemonchus* também foram mais susceptíveis às infecções por *Cooperia*. Amarante et al. (14) encontraram resultados semelhantes em ovinos naturalmente infectados por *Haemonchus* e *Cooperia*. Além da ação espoliadora desses parasitas, outro agravante é que esses nematódeos tem demonstrado resistência a vários anti-helmínticos como a ivermectina, o fosfato de levamisol e o sulfóxido de albendazol (15).

Tabela 2. Frequência absoluta (N°) e frequência relativa (%) da associação entre a classe das fêmeas e os gêneros parasitários envolvidos.

Gênero	Novilha				Vaca				χ^2	Valor de P	Estatísticas	
	Negativo		Positivo		Negativo		Positivo				OR	
	N	%	N	%	N	%	N	%			Ponto	IC95%
<i>Haemonchus</i>	10	32,3	21	67,7	19	37,3	32	62,7	0,04	0,82	0,80	0,31-2,06
<i>Cooperia</i>	20	64,5	11	35,5	45	88,2	6	11,8	5,24	0,02	0,24	0,08-0,75
<i>Ostertagia</i>	20	64,5	11	35,5	37	72,5	14	27,5	0,27	0,60	0,69	0,26-1,79
<i>Trichostrongylus</i>	24	77,4	7	22,6	30	58,8	21	41,2	2,19	0,14	2,40	0,87-6,59
<i>Oesophagostomum</i>	31	100,0	0	0,0	48	94,1	3	5,9	-	0,24	-	-

O presente estudo demonstrou claramente o efeito da idade na ocorrência de helmintoses gastrintestinais, com maior susceptibilidade das novilhas. As novilhas com alta carga parasitária contribuem na contaminação das pastagens. Em vacas já foi verificado que a infecção por nematódeos gastrintestinais leva a queda na produção de leite (16). Porém, em relação às novilhas, Charlier et al. (3) sugeriram que a infecção por nematódeos gastrintestinais durante os dois primeiros anos de vida das fêmeas bovinas pode influenciar negativamente na produção de leite devido à redução do ganho de peso que ocorre nos animais parasitados. Porém, essa hipótese deve ser confirmada em estudos futuros.

CONCLUSÃO

Conclui-se que, em comparação com vacas, as novilhas são mais susceptíveis às infecções por nematódeos gastrintestinais, sendo *Haemonchus*, *Cooperia* e *Ostertagia* os gêneros de parasitas mais prevalentes nestes animais.

REFERÊNCIAS

1. Gibb MJ, Huckle CA, Forbes AB. Effects of sequential treatments with eprinomectin on performance and grazing behaviour in dairy cattle under daily-paddock stocking management. *Vet Parasitol.* 2005;133:79-90.
2. Nogareda C, Mezo M, Uriarte J, Lloveras J, Del Campillo MC. Dynamics of infestation of cattle and pasture by gastrointestinal nematodes in an Atlantic temperate environment. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2006;53:439-44.
3. Charlier J, Höglund J, Von Samson-Himmelstjerna G, Dorny P, Vercruysse J. Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: impact on production, diagnosis and control. *Vet Parasitol.* 2009;164:70-9.
4. Oliveira MC, Alencar MM, Chagas AC, Giglioti R, Oliveira HN. Gastrointestinal nematode infection in beef cattle of different genetic groups in Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;166:249-54.
5. Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura [Internet]. Clima dos municípios paulistas. Campinas: CEPAGRI; 2012 [acesso em 2012 Nov 14]. Disponível em: <http://www.cpa.unicamp.br>
6. Gordon HM, Whitlock HV. A new technique for counting nematodes eggs in sheep faeces. *J Counc Sci Ind Res.* 1939;12:50-2.
7. Roberts F, O'Sullivan P. Methods for eggs counts and larvae cultures for strongyles infesting gastrointestinal tract of cattle. *Aust J Agric Res.* 1950;1:99-102.
8. Ueno H, Gonçalves PC. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4ª ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency; 1998.
9. Bricarello PA, Zaros KG, Coutinho LL, Rocha RA, Kooyman E, De Vries E, et al. Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. *Vet Parasitol.* 2007;148:272-8.
10. Lima WS. Seasonal infection pattern of gastrointestinal nematodes of beef cattle in Minas Gerais State - Brazil. *Vet Parasitol.* 1998;74:203-14.
11. Nicolau CVJ, Amarante AFT, Rocha GP, Godoy WAC. Relação entre desempenho e infecções por nematódeos gastrintestinais em bovinos Nelore em crescimento. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2002;54:351-7.
12. Khan MN, Sajid MS, Khan MK, Iqbal Z, Hussain A. Gastrointestinal helminthiasis: prevalence and associated determinants in domestic ruminants of district Toba Tek Singh, Punjab, Pakistan. *Parasitol Res.* 2010;107:787-94.
13. Canul-Ku HL, Rodríguez-Vivas RI, Torres-Acosta JF, Aguilar-Caballero AJ, Pérez-Cogollo LC, Ojeda-Chi MM. Prevalence of cattle herds with ivermectin resistant nematodes in the hot sub-humid tropics of Mexico. *Vet Parasitol.* 2012;183:292-8.

14. Amarante AFT, Bricarello PA, Rocha RA, Gennari SM. Resistance of Santa Inês Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Vet Parasitol.* 2004;120:91-106.
15. Souza AP, César Itaquí Ramos CI, Bellato V, Sartor AA, Schelbauer CA. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. *Cienc Rural.* 2008;38:1363-7.
16. Barger IA, Gibbs HC. Milk production of cows infected experimentally with trichostrongylid parasites. *Vet Parasitol.* 1981;9:69-73.

Recebido em: 01/06/2012

Aceito em: 03/02/2014

EFICÁCIA “IN VIVO” DA CEFOPERAZONA SÓDICA, GENTAMICINA E CIPROFLOXACINO NO TRATAMENTO INTRAMAMÁRIO DA MASTITE CLÍNICA BOVINA

Sérgio Ricardo Maiolino¹
Márcio Garcia Ribeiro²
Rodrigo Garcia Motta³
Aristeu Vieira da Silva⁴
Glaucea Suman Maiolino⁵
Fernando José Listoni⁶

RESUMO

O presente estudo avaliou a eficácia “in vivo” do tratamento intramamário, convencional e estendido, utilizando a cefoperazona sódica (250 mg), gentamicina (250 mg) e ciprofloxacino (100 mg) em casos de mastite clínica bovina. Foram utilizadas 30 vacas com mastite clínica, não sistêmica, distribuídas em três grupos de dez animais. O tratamento convencional da mastite consistiu em três aplicações do anti-mastítico, a cada 12 horas, e o tratamento estendido foi realizado com seis aplicações do anti-mastítico, a cada 12 horas. As vacas receberam tratamento intramamário, a cada 12 horas, com seis aplicações por animal, constituindo os seguintes momentos (M): M1 (dia zero – diagnóstico da mastite e início do tratamento), M2 (12 horas após M1), M3 (24 horas após M1), M4 (36 horas após M1), M5 (48 horas após M1) e M6 (60 horas após M1). Foi considerado, no mesmo animal, o tratamento convencional encerrado na terceira aplicação do antimicrobiano (M3) e o tratamento estendido ao final da sexta aplicação (M6). Os principais micro-organismos isolados das vacas com mastite foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* sp., *Streptococcus* spp., *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*. A cura clínica do tratamento convencional foi de 50% para o grupo tratado com cefoperazona sódica, 70% para o grupo tratado com gentamicina e 50% para o grupo tratado com ciprofloxacino. Para os mesmos grupos, a cura clínica do tratamento estendido foi 90%, 100% e 80%, respectivamente. A cura bacteriológica foi de 100% para o grupo tratado com cefoperazona sódica e de 90% para os grupos utilizando a gentamicina e ciprofloxacino no tratamento convencional. Para os mesmos grupos, foram observados 100% de cura bacteriológica para a gentamicina e 90% para os grupos com cefoperazona sódica e ciprofloxacino no tratamento estendido. Não foram encontradas diferenças entre cura clínica e cura bacteriológica dentro de cada grupo e entre os grupos de antimicrobianos, tampouco entre os tratamentos convencional e estendido dentro do mesmo grupo ou entre os grupos. Os resultados do presente estudo indicam a importância da lactocultura e do teste de sensibilidade microbiana “in vitro” como respaldo para os tratamentos intramamários de vacas com mastite clínica. Inferiu-se também a boa eficácia na cura clínica e bacteriológica da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento da mastite clínica em vacas na lactação, de forma convencional ou estendida, contanto que respaldado na sensibilidade microbiana “in vitro”.

Palavras-chave: mastite clínica bovina, tratamento intramamário, cura clínica, cura bacteriológica, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

¹ Doutorando em Medicina Veterinária da FMVZ/UNESP, Botucatu. SP. Contato principal para correspondência. FAEF - Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral - Garça – SP.

² Professor Doutor, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP.

³ Doutorando do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP.

⁴ Professor do Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Feira de Santana – BA.

⁵ Mestranda em Medicina Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP.

⁶ Técnico do Laboratório de Microbiologia do Serviço de Diagnóstico Microbiológico, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP.

IN VIVO EFFICACY OF SODIUM CEFOPERAZONE, GENTAMICIN AND CIPROFLOXACIN FOR THE INTRAMAMMARY TREATMENT OF CLINICAL MASTITIS IN COWS.

ABSTRACT

This study evaluated the *in vitro* and *in vivo* efficacy of sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin for the intramammary treatment of clinical mastitis in cows. Thirty cows with non-systemic, clinical mastitis were divided into three groups of ten animals. One of the antibiotics was used in each group for conventional (i.e., three doses, given every 12 hours) and extended (i.e., six doses, every 12 hours) treatments of mastitis. The cows were treated every 12 hours using six doses per animal at the next moments (M): M1, day zero - diagnosis and beginning of treatment; M2, 12 hours from diagnosis and treatment; M3, 24 hours; M4, 36 hours; M5, 48 hours; and M6 60 hours. The most common microorganisms isolated from cows were *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* sp., *Streptococcus* spp., *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*. The efficacy of clinical cure using conventional treatment was 50%, 70% and 50% for the groups treated with sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin, respectively. Regarding the extended treatment, efficacy was 90%, 100% and 80%, for sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin, respectively. Efficacy of bacteriological cure was 100% for sodium cefoperazone, and 90% for both gentamicin and ciprofloxacin using the conventional treatment. By using the extended treatment, efficacy of bacteriological cure was 100% for gentamicin and 90% for both cefoperazone and ciprofloxacin. Statistical differences were not found in clinical or in bacteriological cure into the same group or among groups. Similarly, statistical differences between the conventional and extended treatments were not found. The results from this study reinforce the importance of performing microbiological culture of milk and *in vitro* antimicrobial sensitivity tests for supporting the intramammary treatment of clinical mastitis in cows. The clinical and bacteriological efficacy of sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin in lactating cows suffering from clinical mastitis using either conventional or extended treatments was also inferred, provided the use of sensitivity tests *in vitro*.

Keywords: clinical mastitis in cows, intramammary treatment, clinical cure, bacteriological cure, antimicrobial sensitivity test

EFICACIA *IN VIVO* DE LA CEFOPERAZONA SÓDICA, LA GENTAMICINA Y EL CIPROFLOXACINO EN EL TRATAMIENTO INTRAMAMARIO DE LA MASTITIS CLÍNICA BOVINA.

RESUMEN

El presente estudio comparó la eficacia *in vitro* e *in vivo* de la cefoperazona sódica, la gentamicina y el ciprofloxacino en el tratamiento intramamario de la mastitis clínica bovina. Fueron utilizadas 30 vacas con mastitis clínica sin signos sistémicos, divididas en tres grupos de diez animales. En cada grupo fue utilizado uno de los antibióticos citados antes, para realizar tratamiento convencional (tres aplicaciones a cada 12 horas) y extendido (seis aplicaciones a cada 12 horas) contra mastitis. Las vacas recibieron tratamiento intramamario a cada 12 horas, consistente de seis aplicaciones por animal en los siguientes momentos (M): M1, día cero - diagnóstico e inicio del tratamiento; M2, doce horas después del M1; M3, 24 horas después del M1; M4, 36 horas después del M1; M5, 48 horas después del M1; y M6 60 horas después del M1. Los principales microorganismos aislados de vacas con mastitis fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* sp. *Streptococcus agalactiae*

spp. y *Escherichia coli*. La eficacia de la cura clínica usando tratamiento convencional fue de 50% para el grupo de cefoperazona sódica, 70% para gentamicina y 50% para ciprofloxacino. Con el tratamiento extendido la eficacia de la cura clínica fue de 90%, 100% y 80%, respectivamente. La eficacia de la cura bacteriológica fue de 100% para el grupo cefoperazona sódica y de 90% para los grupos gentamicina y ciprofloxacino utilizando el tratamiento convencional. Así mismo, se observó 100% de cura bacteriológica para gentamicina y 90% para los grupos cefoperazona sódica y ciprofloxacino utilizando el tratamiento extendido. No fueron observadas diferencias estadísticas para la cura clínica y bacteriológica ni dentro ni entre los grupos de antimicrobianos. Tampoco se encontró diferencia entre los tratamientos convencional y extendido dentro del mismo grupo o entre los grupos. Los resultados del presente estudio refuerzan la importancia del cultivo de la leche y de las pruebas de sensibilidad microbiana *in vitro* como respaldo para los tratamientos intramamarios en vacas con mastitis clínica. Los resultados permiten inferir también que la cefoperazona sódica, la gentamicina y el ciprofloxacino son eficaces para la cura clínica y bacteriológica de la mastitis clínica en vacas lactantes, tanto en un esquema de tratamiento convencional como en el tratamiento extendido siempre que se utilicen en combinación con exámenes de sensibilidad microbiana *in vitro*.

Palabras clave: mastitis clínica bovina, tratamiento intramamario, cura clínica, cura bacteriológica, perfil de sensibilidad antimicrobiana

1. INTRODUÇÃO

A mastite figura dentre as doenças que mais oneram a pecuária leiteira, devido à redução na produção, alterações na composição, gastos com medicamentos, honorários veterinários e reposição de animais (1).

A mastite bovina caracteriza-se por processo inflamatório da glândula mamária, que resulta em alterações físicas, químicas, celulares e bacteriológicas do leite, bem como por modificações patológicas do tecido glandular, podendo determinar lesões irreversíveis no parênquima mamário. No entanto, no Brasil poucos estudos avaliaram os custos da mastite, no que tange a redução na produção de leite, depreciação dos animais e gastos com medicamentos, incluindo o tratamento (2, 3).

A mastite é classicamente classificada em clínica e subclínica, de acordo com a severidade e exteriorização do processo inflamatório (1, 4-6). A mastite clínica caracteriza-se por alterações visíveis na glândula mamária e/ou no leite (3, 7, 8). Nestes casos, a glândula mamária pode apresentar sinais de edema, dor, calor, rubor e perda momentânea da função, além de alterações visíveis no leite (formação de grumos, pus, dessora, coágulos) (1-3). Na forma subclínica, somente se observa redução da produção de leite. Nestes animais, o diagnóstico somente é alcançado utilizando métodos que permitam a detecção de alterações na composição e constituintes celulares do leite (4).

O tratamento com antimicrobianos é um dos principais procedimentos em um programa de controle da mastite (7). Diversos protocolos terapêuticos são utilizados na prática veterinária para o tratamento da mastite em vacas na lactação e no período de secagem (8). O tratamento imediato dos casos clínicos e a terapia/profilaxia da vaca seca com o uso de antimicrobianos em todos os quartos mamários, no momento da secagem, estão entre as medidas mais frequentemente recomendadas na abordagem terapêutica da mastite em vacas (1, 4).

Os maiores índices de cura no tratamento por via intramamária da mastite bacteriana em vacas são obtidos com 3 a 5 aplicações, em intervalos de 8, 12 a 24 h (dependendo das características e vida média de cada antimicrobiano (4, 7, 9, 10). Nos casos de mastite subclínica, não existe consenso sobre o tratamento no decorrer da lactação, ficando

geralmente estes animais para serem tratados na terapia da vaca seca, na qual as vacas são tratadas com dose única do anti-mastítico, em todos os tetos, no dia da secagem (7, 9).

Nos casos de mastite por micro-organismos refratários ao tratamento no decorrer da lactação, notadamente por *Staphylococcus aureus*, tem-se preconizado, alternativamente, a terapia estendida, que consiste em 6 a 8 aplicações de anti-mastíticos via intramamária, com intuito de melhorar as taxas de cura clínica e bacteriológica (10). No entanto, esta modalidade alternativa de tratamento apresenta maior custo ao produtor, devido ao maior descarte de leite, e ao maior número de anti-mastíticos requeridos por animal (7, 10).

Diferentes antimicrobianos estão disponíveis comercialmente para o tratamento intramamário da mastite em vacas no Brasil (9). Segundo Ribeiro (7), os princípios ativos de antimicrobianos mais utilizados pertencem ao grupo das penicilinas e derivados, aminoglicosídeos, fluorquinolonas, tetraciclina e sulfas potencializadas pelo trimetoprim.

Toda e qualquer indicação do tratamento da mastite em animais deveria ser respaldada em testes “in vitro” de sensibilidade microbiana (antibiograma). Entretanto, na prática, por questões econômicas, por desconhecimento, dificuldade de acesso aos laboratórios e mão de obra capacitada, ou em casos graves de mastite clínica com sinais sistêmicos que necessitam de terapia emergencial; os testes de sensibilidade microbiana “in vitro” não são realizados, recaindo a escolha do fármaco, na grande maioria das vezes, na experiência acumulada dos profissionais em tratamentos anteriores, ou mesmo no apelo comercial de determinados produtos (7). Ademais, apesar da notória diferença entre a eficácia “in vitro” ou “in vivo” dos antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite, são escassos os estudos conduzidos no intuito de confrontar o resultado “in vitro” de patógenos frente a um dado fármaco, com a eficácia “in vivo” deste mesmo antimicrobiano por via intramamária.

Considerando que a mastite é a principal doença infectocontagiosa que acomete vacas leiteiras, os diferentes protocolos de tratamento (convencional e estendido) e princípios ativos anti-mastíticos disponíveis no Brasil, a variação entre a eficácia “in vitro” e “in vivo” dos fármacos e a escassez no país de dados sobre a relação custo/benefício do tratamento; o presente estudo objetivou avaliar a eficácia do tratamento intramamário utilizando a cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino, nas formas convencional e estendida, na mastite clínica bovina, baseado em testes de sensibilidade “in vitro”.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental

Foi avaliada a cura clínica e bacteriológica do tratamento intramamário, convencional e estendido, em 30 vacas com mastite clínica, sem sinais sistêmicos, naturalmente infectadas, utilizando a cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino. Para o tratamento intramamário, os micro-organismos foram identificados e a inclusão do animal para o tratamento dependeu diretamente da sensibilidade “in vitro” do isolado ao antimicrobiano do grupo tratado. Para o tratamento de somente 10 animais por grupo, houve a necessidade estatística de efetividade geral de, no mínimo, 80% da cefoperazona sódica, 80% da gentamicina e 80% do enrofloxacino em micro-organismos isolados de mastite.

2.2. Animais

Foram utilizadas 30 vacas Holandesas e mestiças que apresentaram mastite clínica, não sistêmica, entre 5 a 10 anos de idade, com produção média de 18 litros de leite, e que não receberam tratamento prévio no decorrer da lactação, procedentes de propriedades leiteiras, que realizam duas ordenhas mecânicas diárias, sem a presença de bezerros, da região de Botucatu, SP.

2.3. Diagnóstico da mastite clínica

O diagnóstico de mastite clínica foi fundamentado por alterações macroscópicas do leite na prova de Tamis (caneca telada de fundo escuro) e/ou na presença de sinais de inflamação na glândula mamária (dor, calor, hiperemia, sensibilidade dolorosa, recusa em permitir o aleitamento dos bezerros). Foi realizado exame físico completo do úbere das vacas (6). As vacas que apresentaram sinais sistêmicos (taquicardia, taquipnéia, febre, atonia ruminal, decúbito) não foram utilizadas no estudo.

Cada quarto mamário com mastite clínica foi considerado uma unidade amostral. Desta forma, o estudo utilizou de 10 animais diferentes para cada grupo de antimicrobiano, não se utilizando mais de um quarto mamário do mesmo animal a título da composição dos grupos de tratamento, ou para fins de cálculo dos valores de cura bacteriológica e cura clínica.

2.4. Grupos de tratamento

Foram constituídos três grupos de tratamento para cada antimicrobiano comercial, como segue: G1 = cefoperazona sódica, 250 mg/aplicação (10 animais); G2 = gentamicina, 250 mg/aplicação (10 animais) e G3 = ciprofloxacino, 100mg/aplicação (10 animais).

2.5. Protocolos de tratamento intramamário (convencional e estendido)

O tratamento intramamário foi realizado respeitando condições adequadas de anti-sepsia (7). Foi iniciado imediatamente após o diagnóstico da mastite clínica, antes do envio do material para o diagnóstico microbiológico. Todas as vacas tratadas que permaneceram na composição dos três grupos de tratamento apresentaram, obrigatoriamente, sensibilidade “in vitro” do isolado ao antimicrobiano do grupo. Com efeito, todos os animais componentes de cada grupo foram tratados com antimicrobianos que apresentaram 100% de efetividade “in vitro” para o isolado. Os animais que, mesmo depois de iniciado o tratamento, acusaram isolados com resultados “in vitro” parcialmente sensíveis ou resistentes no teste de sensibilidade microbiana foram excluídos.

As vacas receberam tratamento intramamário, a cada 12 horas, com seis aplicações por animal, constituindo os seguintes momentos (M): M1 (dia zero – diagnóstico da mastite e início do tratamento), M2 (12 horas após M1), M3 (24 horas após M1), M4 (36 horas após M1), M5 (48 horas após M1) e M6 (60 horas após M1). Foi considerado, no mesmo animal, o tratamento convencional encerrado na terceira aplicação do antimicrobiano (M3) e o tratamento estendido ao final da sexta aplicação (M6).

2.6. Isolamento e caracterização dos micro-organismos

As amostras de leite dos animais com mastite clínica foram colhidas assepticamente, do quarto mamário infectado, de todos os animais nos três grupos no M1, M4 e 12 horas após M6 (M7) e transportadas sob temperatura de refrigeração (4–8°C) até o laboratório de diagnóstico microbiológico da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. Em seguida, foram semeadas nos meios de ágar suplementado com sangue bovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey, mantidos a 37°C, em condições de aerobiose. As culturas foram avaliadas com 24, 48 e 72 horas de incubação e os micro-organismos, identificados segundo as características morfotintórias, bioquímicas e de cultivo (11).

2.7. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”

Todos os micro-organismos isolados dos animais com mastite nos três grupos de estudo (G1 = cefoperazona sódica; G2 = gentamicina e G3 = ciprofloxacino) foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos e os halos de inibição da cefoperazona sódica (75 mcg), gentamicina (10 mcg) e G3 = ciprofloxacino (5 mcg) foram interpretados de acordo com Clinical and Laboratory Standard Institute – CLSI (12).

2.8. Acompanhamento dos animais

Durante o tratamento ao longo dos dias de estudo, os animais foram monitorados quanto aos parâmetros fisiológicos, exame da glândula mamária e teste de Tamis (6).

2.9. Avaliação da cura clínica e cura bacteriológica

A cura clínica foi considerada nos animais que, ao final do tratamento intramamário, não apresentaram quaisquer alterações clínicas nos parâmetros fisiológicos gerais (temperatura, frequências cardíaca e respiratória, movimentos ruminais), na glândula mamária (edema, nódulos, hipertermia), tampouco nas características macroscópicas do leite (teste de Tamis). A cura bacteriológica foi considerada nos quartos mamários que não se obteve o reisolamento do mesmo micro-organismo identificado no M1. Tanto a cura clínica quanto a cura bacteriológica foram avaliadas no M4, para o tratamento convencional e no M7 para o tratamento estendido.

2.10. Grupo controle negativo

Não foi formado grupo controle negativo, devido aos riscos das mastites clínicas, sem instituição de tratamento, visto que foram utilizados animais de terceiros.

2.11. Critérios de exclusão de animais

Foram excluídos animais que, no início ou ao longo do tratamento intramamário, apresentaram qualquer uma das seguintes condições: desenvolveram sinais sistêmicos de mastite (febre, taquicardia, taquipnéia, atonia ruminal, decúbito), não apresentaram sensibilidade “in vitro” ao fármaco do grupo antes do início do tratamento (parcialmente sensíveis ou resistentes), contraíram outras infecções que houvesse necessidade do uso de antimicrobianos por via parenteral, impossibilidade de qualquer tratamento e/ou colheita de leite segundo protocolo de estudo, isolamento de micro-organismos não convencionais e/ou usualmente não responsivos a terapia antimicrobiana (fungos, leveduras, algas).

2.12. Tratamento estatístico dos resultados

Foram comparados os diferentes momentos (M1, M2, M3, M4, M5, M6), segundo a efetividade de cura bacteriológica do produto, utilizando o teste bilateral ou de Qui-quadrado (Teste de McNemar), considerando significância estatística para valores de $P < 0,01$.

Para a definição do universo amostral (n) para efeito de comparação entre os grupos de antimicrobianos foram necessários, no mínimo, dez animais com mastite (segundo os itens 4.2 a 4.4), adotando efetividade “in vitro” de $\geq 80\%$ de cada fármaco e erro estatístico de 1% (13). A efetividade “in vitro” de, no mínimo, 80% da cefoperazona sódica, 80% da gentamicina e 80% do enrofloxacino para uso destes antimicrobianos no estudo, que permitisse o uso de 10 animais/grupo, foi embasada em levantamento retrospectivo destes

Maiolino SR. et al. Eficácia “in vivo” da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário da mastite clínica bovina. Vet. e Zootec. 2014 mar.; 21(1): 160-176.

fármacos em dados do Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos, em diferentes linhagens bacterianas isoladas de vacas com mastite, frente à cefoperazona sódica. Botucatu, SP, 2008 a 2012*.

Sensibilidade Micro-organismo	Sensível	Parcialmente sensível	Resistente
	nº linhagens/nº total (%)	nº linhagens/nº total (%)	nº linhagens/nº total (%)
<i>Corynebacterium sp.</i>	29/29 (100)	0	0
<i>S. aureus</i>	22/32 (68,7)	7/32 (21,8)	3/32 (9,3)
<i>Streptococcus alfa hemolítico</i>	18/18 (100)	0	0
<i>Streptococcus spp.</i>	13/16 (81,3)	3/16 (18,7)	0
<i>Staphylococcus spp.</i>	7/10 (70)	3/10 (30)	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6/6 (100)	0	0
<i>Streptococcus dysgalacteae</i>	6/6 (100)	0	0
<i>Staphylococcus beta hemolítico</i>	4/10 (28,5)	5/10 (64,3)	1/10 (7,2)
<i>T. pyogenes</i>	2/2 (100)	0	0
<i>Edwardsiella tarda</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Micrococcus sp.</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Streptococcus beta hemolítico</i>	1/1 (100)	0	0
<i>S. aureus ATCC 25923</i>	1/1 (100)	0	0
Total	114/136 (83,8)	18/136 (13,3)	4/136 (2,9)

T. pyogenes = *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*; *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*

* Fonte = Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais – Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais – FMVZ-UNESP/Botucatu, SP

ATCC = American Type Culture Collection

Tabela 2. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos, em diferentes linhagens bacterianas isoladas de vacas com mastite, frente à gentamicina. Botucatu, SP, 2008 a 2012*.

Sensibilidade Micro-organismo	Sensível	Parcialmente sensível	Resistente
	n° linhagens/n° total (%)	n° linhagens/n° total (%)	n° linhagens/n° total (%)
<i>Staphylococcus beta hemolítico</i>	57/63 (90,4)	3/63 (4,8)	3/63 (4,8)
<i>Staphylococcus aureus</i>	37/40 (92,5)	2/40 (5,0)	1/40 (2,5)
<i>Corynebacterium sp.</i>	29/29 (100)	0	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	11/14 (78,6)	1/14 (7,1)	2/14 (14,3)
<i>Staphylococcus spp.</i>	11/14 (78,6)	1/14 (7,1)	2/14 (14,3)
<i>Streptococcus spp.</i>	7/13 (53,8)	0	6/13 (46,2)
<i>Streptococcus alfa hemolítico</i>	9/12 (75,0)	1/12 (8,3)	2/12 (16,7)
<i>Escherichia coli</i>	6/6 (100)	0	0
<i>Streptococcus agalactee</i>	4/4 (100)	0	0
<i>T. pyogenes</i>	3/6 (50)	1/6 (16,6)	2/6 (33,4)
<i>Edwardsiella tarda</i>	2/2 (100)	0	0
<i>Nocardia sp.</i>	2/2 (100)	0	0
<i>Pasteurella mutocida</i>	2/2 (100)	0	0
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1/3 (33,3)	0	2/3 (66,7)
<i>Escherichia coli ATCC 11229</i>	1/1 (100)	0	0
Total	183/212 (86,3)	9/212 (4,3)	20/212 (9,4)

T. pyogenes = *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*

* Fonte = Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais – Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais – FMVZ-UNESP/Botucatu, SP

ATCC = American Type Culture Collection

Tabela 3. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos, em diferentes linhagens bacterianas isoladas de vacas com mastite, frente ao ciprofloxacino. Botucatu, SP, 2008 a 2012*.

Sensibilidade Micro-organismo	Sensível	Parcialmente sensível	Resistente
	nº linhagens/nº total (%)	nº linhagens/nº total (%)	nº linhagens/nº total (%)
<i>Streptococcus spp.</i>	36/43 (83,7)	4/43 (9,3)	3/43 (7,0)
<i>Staphylococcus spp.</i>	36/37 (97,3)	0	1/37 (2,7)
<i>Corynebacterium sp.</i>	29/29 (100)	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	12/24 (50)	9/24 (37,5)	3/24 (12,5)
<i>Streptococcus alfa hemolítico</i>	12/18 (66,7)	6/18 (33,3)	0
<i>Escherichia coli</i>	4/5 (80)	0	1/5 (20)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4/4 (100)	0	0
<i>T. pyogenes</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1/3 (33,3)	1/3 (33,3)	1/3 (33,3)
<i>Micrococcus spp.</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Nocardia sp.</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	1/5 (20,0)	2/5 (40,0)	2/5 (40,0)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Streptococcus beta hemolítico</i>	1/1 (100)	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 15221	1/1 (100)	0	0
Total	141/174 (81,1)	22/174 (12,6)	11/174 (6,3)

T. pyogenes = *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*

* Fonte = Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais – Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais – FMVZ-UNESP/Botucatu, SP

ATCC = American Type Culture Collection

3. RESULTADOS

Para a formação dos três grupos de tratamento, constituídos de dez animais por grupo, foram utilizados 54 animais, dos quais 22 para o grupo de tratamento com cefoperazona sódica, 19 para o grupo de gentamicina e 13 para o ciprofloxacino. Desta forma, ao longo da constituição dos grupos, foram excluídos 24 animais, principalmente cujos isolados foram parcialmente sensíveis ou resistentes no perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” antes do tratamento (M1), que apresentaram isolamento de micro-organismos não convencionais de mastite (fungos, algas e certos actinomicetos) ou, com menor frequência, que não foi possível a colheita de material em algum dos momentos de acompanhamento do animal ou que desenvolveram sinais de mastite clínica sistêmica.

O Quadro 1 apresenta os micro-organismos causadores de mastites em cada animal, dentro de cada grupo de antimicrobiano constituído para o tratamento intramamário, em vacas com mastite clínica, naturalmente infectadas.

Quadro 1. Micro-organismos isolados, em cultura pura ou em associação, em 30 vacas com mastite clínica, naturalmente infectadas, segundo três grupos de tratamento antimicrobiano por via intramamária. Botucatu, SP, 2010 a 2011.

GRUPO ANIMAL	CEFOPERAZONA SÓDICA (G1)	GENTAMICINA (G2)	CIPROFLOXACINO (G3)
1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Corynebacterium bovis</i>
2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
3	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
4	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico <i>Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes</i>	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico
5	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico
6	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>
7	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico
8	<i>Staphylococcus intermedius</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico <i>Staphylococcus aureus</i>
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
10	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>

Foi observado predomínio dos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus* nos três grupos de estudo, seguido em menor frequência de enterobactérias (*Escherichia coli* e *Edwardsiella tarda*) e actinomicetos [*Corynebacterium bovis* e *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*].

Os Quadros 2, 3 e 4 resumem os resultados da cura clínica e bacteriológica nos três grupos de tratamento intramamário (convencional e estendido), utilizando a cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino, em vacas com mastite clínica naturalmente infectadas.

Quadro 2. Cura clínica e bacteriológica em dez vacas com mastite por diferentes micro-organismos, utilizando a cefoperazona sódica no tratamento convencional (3 aplicações do anti-mastítico) e no estendido (6 aplicações do anti-mastítico). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Animal	Isolamento - M 1	Tratamento convencional (cura clínica)	Isolamento - M4 (cura bacteriológica)	Tratamento estendido (cura clínica)	Isolamento - M7 (cura bacteriológica)
1	<i>S. agalactiae</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
2	<i>S. agalactiae</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
3	<i>Staphylococcus</i> spp.	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
4	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico <i>T. pyogenes</i>	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
5	<i>Edwardsiella tarda</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
6	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
7	<i>Streptococcus</i> spp.	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
8	<i>S. intermedius</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
9	<i>S. aureus</i>	insucesso	Negativo	insucesso	<i>E. coli</i> , <i>S.aureus</i> e <i>Streptococcus</i> spp.
10	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo

S. agalactiae = *Streptococcus agalactiae*

T. pyogenes = *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*

S. intermedius = *Staphylococcus intermedius*

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

E. coli = *Escherichia coli*

Quadro 3. Cura clínica e bacteriológica em dez vacas com mastite por diferentes micro-organismos, utilizando a gentamicina no tratamento convencional (3 aplicações do anti-mastítico) e no estendido (6 aplicações do anti-mastítico). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Animal	Isolamento - M 1	Tratamento convencional (cura clínica)	Isolamento - M4 (cura bacteriológica)	Tratamento estendido (cura clínica)	Isolamento - M7 (cura bacteriológica)
1	<i>Streptococcus</i> spp.	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
2	<i>Escherichia coli</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
3	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
4	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	insucesso	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	sucesso	Negativo
5	<i>Streptococcus</i> spp	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
6	<i>Streptococcus</i> spp.	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
7	<i>Streptococcus</i> spp.	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
8	<i>Staphylococcus hyicus</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
9	<i>Streptococcus</i> spp	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
10	<i>Streptococcus</i> spp	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo

Quadro 4. Cura clínica e bacteriológica em dez vacas com mastite por diferentes micro-organismos, utilizando o ciprofloxacino no tratamento convencional (3 aplicações do anti-mastítico) e no estendido (6 aplicações do anti-mastítico). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Animal	Isolamento - M 1	Tratamento convencional (cura clínica)	Isolamento - M4 (cura bacteriológica)	Tratamento estendido (cura clínica)	Isolamento - M7 (cura bacteriológica)
1	<i>Corynebacterium bovis</i>	sucesso	<i>Corynebacterium bovis</i>	sucesso	Negativo
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
3	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	insucesso	Negativo	insucesso	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
4	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
5	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	insucesso	Negativo	insucesso	Negativo
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
7	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
9	<i>Streptococcus</i> spp.	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo

As Tabelas 4 e 5 apresentam a avaliação estatística dos resultados da cura clínica e bacteriológica das vacas com mastite, segundo os três grupos de antimicrobianos.

Tabela 4. Eficácia da cura clínica do tratamento intramamário (convencional e estendido) de vacas com mastite clínica, utilizando cefoperazona sódica (G1), gentamicina (G2) e ciprofloxacino (G3). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Grupo	Tratamento	
	Convencional	Estendido
	% (n)	% (n)
Cefoperazona Sódica ¹	50 (5)	90 (9)
Gentamicina ²	70 (7)	100 (10)
Ciprofloxacino ³	50 (5)	80 (8)

(n) = número de animais do grupo correspondente.

1 = Estatística: valor de P=0,1336 (Teste de χ^2 de McNemar).

2 = Estatística: valor de P=0,2482 (Teste de χ^2 de McNemar).

3 = Estatística: valor de P=0,2482 (Teste de χ^2 de McNemar).

Não foi observada diferença estatística significativa ($P>0,01$) em nenhum grupo de fármaco, quando se comparou o tratamento convencional e o tratamento estendido dentro do mesmo grupo. No entanto, no grupo tratado com cefoperazona sódica foram observados cinco animais (50%) que apresentaram cura clínica após o tratamento convencional e nove animais (90%) após o tratamento estendido. Depois de efetuado o tratamento convencional no grupo da gentamicina, sete animais (70%) apresentaram cura clínica e a totalidade do grupo (100%) se mostrou curado após o tratamento estendido. O grupo tratado com ciprofloxacino apresentou cinco animais (50%) com cura clínica após o tratamento convencional e oito animais (80%) apresentaram cura clínica após o tratamento estendido.

Tabela 5. Eficácia de cura bacteriológica do tratamento intramamário (convencional e estendido) de vacas com mastite clínica, utilizando cefoperazona sódica (G1), gentamicina (G2) e ciprofloxacino (G3). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Grupo	Tratamento	
	Convencional	Estendido
	% (n)	% (n)
Cefoperazona Sódica ¹	100 (10)	100 (10)
Gentamicina ²	90 (9)	100 (10)
Ciprofloxacino ³	90 (9)	100 (10)

(n) = número de animais do grupo correspondente.

1 = Estatística: valor de P=1,0000 (Teste de χ^2 de McNemar).

2 = Estatística: valor de P=1,0000 (Teste de χ^2 de McNemar).

3 = Estatística: valor de P=0,4795 (Teste de χ^2 de McNemar).

A eficácia da cura bacteriológica foi observada nos três grupos, sem diferença estatística significativa ($P>0,01$) em nenhum dos grupos quando o tratamento convencional foi comparado com o tratamento estendido. Apenas um animal tratado com gentamicina e outro com ciprofloxacino apresentaram reisolamento do agente causal inicial da mastite clínica, respectivamente, *Streptococcus* alfa hemolítico e *Corynebacterium bovis*.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigada a ação da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino por via intramamária em casos de mastite clínica em vacas, que se constituem em representantes, respectivamente, de cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluorquinolonas, considerados os principais grupamentos de antimicrobianos em uso no Brasil no tratamento intramamário de vacas com mastite na lactação (7, 9, 10).

Devido ao grande número de tratamentos de vacas com mastite realizados no Brasil sem o respaldo da cultura microbiológica e de testes “in vitro” de sensibilidade microbiana, a resolução clínica (cura clínica) dos casos é um critério prático adotado na rotina das propriedades para avaliar a eficácia do tratamento. Nestes animais, se considera que a resolução favorável dos casos ocorre quando após 2 ou 3 aplicações do antimicrobiano por via intramamária, se observa regressão da hiperemia e do edema do úbere e tetos, além da normalização do aspecto do leite (7).

Com base no teste de sensibilidade microbiana “in vitro” (100% de sensibilidade dos isolados ao fármaco do grupo), foi obtido nos 30 animais estudados à cura clínica em 50% das vacas utilizando a cefoperazona sódica, 70% dos animais com a gentamicina e 50% dos casos para a ciprofloxacino no tratamento convencional, enquanto no tratamento estendido foi obtida a cura clínica para os mesmos animais e fármacos em, respectivamente, 90%, 100% e 80%. Utilizando outro antimicrobiano do grupo das cefalosporinas (cefacetil), Auginer e Austin (14) obtiveram valor similar, com 82% de cura clínica na terapia intramamária de vacas com mastite clínica. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que é possível utilizar a cura clínica de vacas como critério de resolução dos casos de mastite em vacas, sem sinais sistêmicos, tratadas por via intramamária, contanto que a instituição do tratamento - convencional ou estendido - tenha sido respaldada em testes “in vitro” de sensibilidade microbiana.

O cultivo microbiológico do leite é o melhor parâmetro de avaliação do tratamento no decorrer da lactação de casos de mastite em vacas, pois permite atestar a ausência de isolamento do agente causal no leite, depois de encerrado o tratamento (cura bacteriológica) [7]. Nos 30 animais tratados no presente estudo, foi obtida a cura bacteriológica utilizando a cefoperazona sódica em 100% dos animais e em 90% dos casos com a gentamicina e ciprofloxacino no tratamento convencional, enquanto para os mesmos animais e fármacos, foi

Maiolino SR. et al. Eficácia “in vivo” da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário da mastite clínica bovina. Vet. e Zootec. 2014 mar.; 21(1): 160-176.

obtida cura bacteriológica em, respectivamente, 90%, 100% e 90% no tratamento estendido. Não foi observada diferença ($P>0,01$) na cura bacteriológica entre os tratamentos convencional e estendido nos 30 animais supracitados. No Rio de Janeiro, Langenegger, Figueiredo e Rezende (15) avaliaram a eficiência terapêutica de outra cefalosporina (cefacetril) em 47 quartos mamários com mastite subclínica, e assinalaram resultados semelhantes, obtendo 74% de cura bacteriológica nos quartos com infecções por *Staphylococcus* sp. Langoni et al. (16), no estado de São Paulo, realizaram o tratamento intramamário de sete quartos mamários de vacas com mastite clínica utilizando fluorquinolona de segunda geração (enrofloxacina) e observaram cura bacteriológica em seis quartos (85,7%). Costa et al. (17), no estado de São Paulo, obtiveram êxito na cura clínica de, respectivamente, 81,82% e 90,48% de 18 casos de mastite (clínica) em vacas causadas por *Staphylococcus* sp. e 19 por *Streptococcus* sp., utilizando derivados β -lactâmicos. As nuances entre os percentuais de efetividade de cura clínica e/ou bacteriológica dos fármacos nos diferentes estudos podem encontrar reflexo na ação intrínseca de cada fármaco frente aos isolados, na presença de linhagens resistentes - estafilococos produtores de β -lactamases -, assim como no tratamento de micro-organismos não responsivos aos antimicrobianos convencionais (fungos, algas e certos actinomicetos).

No presente estudo, houve incremento na cura bacteriológica de somente 10% (animal 4) do tratamento convencional comparado ao estendido no grupo da gentamicina. Nos demais, foi observada à mesma taxa de cura (90%) para o ciprofloxacino e decréscimo em 10% (animal 9) da cura bacteriológica no tratamento estendido, utilizando a cefoperazona sódica. Neste último grupo (G1), a ausência de isolamento de *S. aureus* no momento 4 (tratamento convencional) e reisolamento no momento 7 (tratamento estendido), poderia encontrar justificativa na eliminação intermitente de *S. aureus* pela glândula mamária ou pela característica intracelular da bactéria, que dificultam o tratamento no decorrer da lactação (6, 10, 18).

Nas 30 vacas com mastite clínica tratadas por via intramamária com três fármacos distintos, foi observada cura clínica de 50% a 70% dos casos quando submetidos ao tratamento convencional, enquanto a cura bacteriológica - com os mesmos animais e fármacos - variaram de 90% a 100%. Tal disparidade entre a cura clínica e bacteriológica poderia ser justificada pelo fato de que apesar dos três fármacos apresentarem efetividade na cura bacteriológica, o processo inflamatório e, conseqüentemente, os sinais clínicos mamários ainda persistem por sete dias ou mais, depois de encerrado o tratamento, mesmo com a inativação do agente causal da mastite (10, 19).

No presente estudo foi observado déficit de somente 10% entre a sensibilidade “in vitro” dos isolados e a cura bacteriológica após o tratamento intramamário “in vivo”, tanto na forma convencional como na estendida. Em contraste, Apparao, Oliveira e Ruegg (20) nos EUA, compararam o perfil de sensibilidade microbiana e o tratamento “in vivo” com pirlimicina de 132 vacas (178 glândulas mamárias) com mastite subclínica causadas por 194 linhagens bacterianas, e não observaram melhora significativa nos índices de cura nos isolados sensíveis “in vitro” ao fármaco. Apesar da divergência dos autores sobre a eficácia do perfil de sensibilidade “in vitro” como base para o tratamento intramamário de vacas com mastite (7, 9, 10, 18, 21), no presente estudo houve concordância entre a sensibilidade “in vitro” de bactérias convencionais de mastite, obtidas de vacas naturalmente infectadas. Este resultado reforça a indicação do teste de sensibilidade microbiana “in vitro” previamente a instituição da terapia, visando o uso racional de antimicrobianos no tratamento da mastite clínica bovina.

No tratamento da mastite, os isolados sensíveis “in vitro” cuja cura bacteriológica não é obtida “in vivo” depois do tratamento, poderiam ser justificados pela presença de outros fatores que concorrem para a resolução dos processos de mastite – além da ação dos antimicrobianos –, como a viabilidade intracelular de bactérias, formação de microabscessos

ou (pio) granulomas mamários, produção de enzimas (β -lactamases) e excesso de material purulento, que dificultam a ação de certos antimicrobianos no foco infeccioso na glândula mamária (6, 7, 9, 10).

Para a formação dos três grupos de dez animais para o tratamento, com cada fármaco, foi necessário utilizar, ao todo, 54 animais. Desta forma, foram excluídos 24 animais, dos quais em cerca de 90% dos casos foram retirados dos grupos de estudo, posto que apresentavam isolados resistentes ou parcialmente sensíveis ao fármaco do grupo, ou eram micro-organismos não responsivos aos tratamentos com antimicrobianos convencionais por via intramamária - como fungos, algas e certos actinomicetos - quesitos considerados de descarte nos critérios de exclusão do presente estudo. Esta conduta, na formação dos grupos, reforça a importância do teste de sensibilidade microbiana “in vitro” previamente a instituição do tratamento intramamário dos casos clínicos de mastite em vacas, visto que, dentre os 24 animais excluídos supracitados com isolados não sensíveis aos fármacos, ou micro-organismos não convencionais na casuística de mastite, certamente resultariam em insucesso terapêutico em condições de campo. Este resultado salienta, também, a importância do exame microbiológico antes do início do tratamento dos casos de mastite bovina, que possibilita nortear as ações de controle/profilaxia da mastite, distintas para micro-organismos de origem contagiosa e ambiental (10, 18). A lactocultura permite identificar micro-organismos não convencionais de mastite, ou não responsivos aos tratamentos intramamários e/ou parenterais em casos de mastite bovina ao longo da lactação, cuja recomendação seria a ablação química dos quartos, ou mesmo o descarte precoce dos animais (7).

A terapia estendida é uma modalidade de tratamento da mastite em vacas indicada no decorrer da lactação, realizada com 6 a 8 aplicações de antimicrobianos por via intramamária, que tem mostrado incremento nas taxas de cura em certos casos de mastite (10). No presente estudo, não houve diferença ($P>0,01$) na cura bacteriológica comparando o tratamento convencional e o estendido, para os três fármacos utilizados em animais com mastite clínica. Em estudo similar, Kasravi et al. (22) no Irã, compararam o efeito do tratamento convencional e do estendido em vacas com mastite subclínica utilizando a cefquinoma. Foram constituídos três grupos de animais, dos quais o grupo 1 (25 vacas e 52 quartos) foi tratado com tratamento convencional (três aplicações a cada 16 horas), o grupo 2 (26 vacas e 58 quartos) com tratamento estendido (seis aplicações e a cada 16 horas) e o terceiro grupo não tratado (22 vacas e 40 quartos). Os principais agentes isolados foram estafilococos coagulase negativos, estreptococos e coliformes. A cura bacteriológica nos três grupos foi, respectivamente, 84,61%, 91,37% e 20%. Não foi observada diferença ($P>0,01$) entre o tratamento convencional e estendido. Em contraste, Roy et al. (23), no Canadá, investigaram a eficácia da terapia estendida em vacas cronicamente infectadas por *S. aureus* utilizando a cefapirina sódica. Foram tratadas 31 vacas cronicamente infectadas provenientes de 14 rebanhos selecionados aleatoriamente, tratadas por cinco dias consecutivos, a cada 12 horas, comparados a outro grupo de 30 animais não tratados. A cultura microbiológica foi realizada com 10, 24 e 31 dias após o encerramento do tratamento. Foram observadas taxas de cura nos grupos tratados e controle de, respectivamente, 25,8% e 3,3% ($P=0,013$), mostrando incremento nas taxas de cura do tratamento estendido em vacas com infecções persistentes por *S. aureus*.

Tais achados indicam que a terapia mamária estendida deve ser reservada para situações específicas de tratamento – como infecções recorrentes por *S. aureus* ou por agentes não convencionais de mastite, que se opta por tratar ao longo da lactação (7) – em virtude do aumento no manejo na propriedade, devido ao maior número de aplicações mamárias por animal, bem como pelo custo adicional dos anti-mastíticos.

5. CONCLUSÃO

As taxas de cura clínica dos animais acima de 90% utilizando a cefoperazona sódica, gentamicina ou ciprofloxacino indicam que estes fármacos se constituem em ótimas alternativas para o tratamento da mastite clínica em vacas na lactação;

Com base no perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, previamente ao tratamento intramamário, foi obtida entre 90 a 100% de cura bacteriológica nos animais utilizando os três fármacos, reforçando a importância de instituição do tratamento da mastite clínica em vacas com respaldo em testes de sensibilidade microbiana “in vitro”;

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as taxas de cura bacteriológica comparando o tratamento intramamário convencional e o estendido para os três grupos de antimicrobianos, em vacas com mastite clínica, naturalmente infectadas, indicando que a terapia estendida deve ser reservada para casos específicos de mastite bovina.

6. REFERÊNCIAS

1. Langoni, H. Agentes emergentes na etiologia da mastite. Rev Bras Med Vet. 1997;19:238-40.
2. Costa EO, Garino F, Melville PA, Ribeiro AR, Silva JAB, Watanabe ET, et al. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. Napgama. 2000;3:6-13.
3. Nader Filho A, Mangerona ACS, Moura ES. Eficácia da associação sinérgica de betalactâmicos em suspensão oleosa no tratamento intramamário da mastite de vacas em lactação. Napgama. 2002;5:20-2.
4. Costa EO, Garino Jr F, Padovese L, Santos E. Avaliação da eficácia de tratamentos de mastite clínica em vacas em lactação. Napgama. 2003;6:3-9.
5. Fonseca LFL, Santos MV. Qualidade do leite e controle da mastite. Lemos Editorial: São Paulo; 2000.
6. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 10ª ed. London: W.B. Saunders; 2007.
7. Ribeiro MG. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: Andrade SF, editor. Manual de terapêutica veterinária. 3ª ed. Roca: São Paulo; 2008. p.759-71.
8. Langoni H, Toni FB, Cabral KG, Cavaliero MJ. Tratamento da mastite bovina com associação ampicilina + cloxacilina. Napgama. 1999;2:21-3.
9. Costa EO. Uso de antimicrobianos na mastite. In: Spinosa HS, Gorniak SL, Bernardi MM. Farmacologia aplicada a medicina veterinária. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. cap. 42, p.422-33.
10. Santos MV, Fonseca LFL, editors. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole; 2007.

11. National Mastitis Council. Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison: NMC; 1999.
12. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M100-S23. Twenty-third information supplement. Wayne, PA: CLSI; 2013.
13. Triola MF. Introdução à estatística. 9ª ed. Rio de Janeiro: LTC; 2005.
14. Auginer SPM, Austin FH. A study of efficacy of intramammary antibiotics in the treatment of clinical mastites. *Brit Vet J.* 1987;143:88-90.
15. Langenegger J, Figueiredo MP, Rezende EF. Eficácia terapêutica do cefacetril frente aos micro-organismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* isolados de mastites subclínicas. *Hora Vet.* 1986;5(30):24-7.
16. Langoni H, Pulga ME, Domingues PF, Silva AV. Eficácia da enrofloxacin no tratamento de casos de mastite bovina de origem ambiental em propriedade leiteira. *Napgama.* 2001;4:19-22.
17. Costa EO, Garino Jr F, Padovese L, Santos E. Avaliação da eficácia de tratamentos de mastite clínica em vacas em lactação. *Napgama.* 2003;6:3-9.
18. Philpot WN, Nickerson SC. Vencendo a luta contra a mastite. São Paulo: Westfalia Landtechnik do Brasil; 2002.
19. Schalm OW, Carrol E, Jain NC. Bovine mastitis. Philadelphia: Lea & Febiger; 1971.
20. Apparao D, Oliveira L, Ruegg PL. Relationship between results of in vitro susceptibility tests and outcomes following treatment with pirlimycin hydrochloride in cows with subclinical mastitis associated with gram-positive pathogens. *J Am Vet Med Assoc.* 2009;234:1437-46.
21. Hoe FG, Ruegg PL. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;227:1461-8.
22. Kasravi R, Bolourchi M, Farzaneh N, Seifi HA, Barin A, Hovareshti P, et al. Efficacy of conventional and extended intra-mammary treatment of persistent sub-clinical mastitis with cefquinome in lactating dairy cows. *Trop Anim Health Prod.* 2011;43:1203-10.
23. Roy JP, Descôteaux L, Dutremblay D, Beaudry F, Elsener J. Efficacy of a 5-day extended therapy program during lactation with cephapirin sodium in dairy cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *Can Vet J.* 2009;50:1257-62.

Recebido em: 01/04/2013

Aceito em: 18/02/2014

EFICÁCIA TERAPÊUTICA E RESIDUAL DE SEIS FORMULAÇÕES INSETICIDAS SOBRE O PARASITISMO POR LARVAS DE *Dermatobia hominis* EM BOVINOS

Teresa Cristina Goulart Oliveira-Sequeira¹
Rogério Martins Amorim²
Alexandre Secorun Borges³
Milena Palmeira Reis Brant⁴

RESUMO

A eficácia imediata e o poder residual de seis formulações químicas comercialmente disponíveis para o controle de infestações por larvas de *Dermatobia hominis* foram avaliados em bovinos da raça Nelore. Quarenta e oito fêmeas, naturalmente infestadas, foram divididas em seis grupos de oito animais com base no número de larvas presentes no dia do tratamento. A contagem do número de larvas foi feita em ambos os lados dos animais antes do tratamento e semanalmente após o tratamento até a sexta semana. Os animais foram tratados com produtos contendo os seguintes princípios ativos e respectivas concentrações: Triclorfon (1 ml/4 kg), DDVP (15 mL/10 L), Cipermetrina/Butóxido de Piperonila (10 mL/10 L), Ivermectina 1% (200 mcg/kg), Doramectina 1% (200 mcg/kg) e Doramectina 1% (50 mcg/kg). As análises dos resultados revelaram que todos os tratamentos produziram redução significativa das infestações ($p < 0,01$), não havendo diferença de eficácia entre os produtos. A inexistência de diferença estatística entre a eficácia imediata e residual proporcionada pelos diferentes tratamentos ($p < 0,05$) contrastou com a percepção visual empírica de que as lactonas macrocíclicas teriam apresentado eficácia maior que os produtos a base de organofosforados ou piretróides. Os resultados obtidos não sustentam a suspeita de resistência a nenhuma das substâncias testadas.

Palavras-Chave: *Dermatobia hominis*, controle, lactonas-macrocíclicas organofosforados, piretróides

THERAPEUTIC AND PROTECTIVE EFFICACY OF SIX PARASITICIDES IN CONTROLLING *Dermatobia hominis* INFESTATION IN CATTLE

ABSTRACT

The immediate efficacy and residual effect of six commercially available parasiticides to control infestations by *Dermatobia hominis* were evaluated in a Nelore cattle herd. Forty-eight naturally infested females were divided into six groups of eight animals on the basis of the number of *D. hominis* nodules present at the day of treatment. The number of cutaneous nodules was determined by manual counting of larvae on both side of each animal. The counting was performed before treatment and weekly after the treatment in the follow six weeks. The animals were dosed with commercial products containing the following principles and concentrations: Trichlorfon (1 mL/4 kg), DDVP (15 mL/10 L),

¹ Professor Adjunto do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista/UNESP-Botucatu. Contato principal para correspondência.

² Professor Assistente Doutor do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista/UNESP-Botucatu

³ Professor Adjunto do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista/UNESP-Botucatu

⁴ Curso de Pós graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista/UNESP-Botucatu

Cipermetrin/Piperonil Butoxide(10 mL/10 L), Ivermectin 1% (200 mcg/kg), Doramectin 1% (200 mcg/kg) e Doramectin 1% (50 mcg/kg). All the treatments produced a significant reduction of larval infestation ($p<0.01$) in all animal groups. The immediate and residual effectiveness showed no statistical difference ($p<0.05$) contrasting with the empirical perception by which the macrocyclic lactones provides a higher effectiveness compared to organophosphates and pyrethroids drugs. Data obtained in this work showed that there is no evidence of resistance of *D. hominis* to any of the drugs tested.

Keywords: *Dermatobia hominis*, control, macrocyclic-lactones, organophosphates, pyrethroids

EFICACIA TERAPÉUTICA Y RESIDUAL DE SEIS FORMULACIONES INSECTICIDAS SOBRE LA INFESTACIÓN DE *Dermatobia hominis* EN GANADO

RESUMEN

Se evaluarán la eficacia inmediata y el efecto residual de seis formulaciones químicas disponibles comercialmente para el control de infestaciones de larvas de *Dermatobia hominis*. Cuarenta y ocho hembras de la raza Nelore, infestadas naturalmente, fueran divididas en seis grupos de ocho animales, basados en el número de larvas presentes en el día de tratamiento. La contaje del número de larvas se realizó en ambos lados de los animales antes del tratamiento y cada semana después del tratamiento hasta la sexta semana. Los animales fueran dosificados con los siguientes ingredientes activos y respectivas concentraciones: triclorfón (1 ml / 4 kg), DDVP (15 ml/10 L), Cipermetrina / butóxido de piperonilo (10 ml/10 L), 1% de ivermectina (200 mcg / kg) Doramectina 1% (200 mcg / kg) y doramectina 1% (50 mcg / kg). La análisis de los resultados reveló que todos los tratamientos produjeron una reducción significativa de la infestación ($p<0,01$), sin diferencia estadística entre los productos. Esta falta de diferencia entre los distintos tratamientos ($p<0,05$) contrastó con la percepción visual y empírica de que las lactonas macrocíclicas fueran más eficaces que los organofosforados o piretroides. Los resultados obtenidos refutan la sospecha de resistencia a las sustancias ensayadas.

Palabras clave: *Dermatobia hominis*, control, lactonas-macroscíclicas organofosforados, piretroides

INTRODUÇÃO

O parasitismo por *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) é endêmico na América Latina (1) e, no Brasil, é registrado na maioria dos municípios brasileiros (2). As perdas econômicas impostas à pecuária bovina e as implicações do parasitismo humano fazem com que este díptero seja considerado a segunda mais importante causa de miíases em sua área de distribuição, e a mais importante espécie da família Cuterebridae (3).

Várias espécies de mamíferos domésticos e silvestres podem ser afetadas, mas em termos econômicos o parasitismo de bovinos é o mais relevante. Os prejuízos incluem a redução na produção de carne e leite, retardo no crescimento dos animais e intensa desvalorização dos couros (4). Os danos produzidos ao couro bovino comprometem de forma expressiva o desempenho da indústria de calçados e de outros produtos derivados do couro (5). Os prejuízos econômicos são particularmente relevantes para o país, já que o rebanho bovino do Brasil é um dos maiores do mundo, possui alta taxa de crescimento

populacional e as exportações brasileiras de produtos derivados da exploração de bovinos vêm aumentando (6).

Embora o controle das infestações pelas larvas de *D. hominis* dependa exclusivamente da aplicação de inseticidas (7), não existem relatos de desenvolvimento de resistência deste parasita a nenhum grupo químico de drogas inseticidas. No entanto, a existência de grande número de organismos resistentes às drogas (desde bactérias até artrópodes) é uma realidade amplamente conhecida no ambiente agropecuário, e por isso, a percepção empírica de perda ou diminuição de eficácia dos inseticidas contra as larvas de *D. hominis* tem sido frequentemente atribuída à emergência de parasitas resistentes por parte dos pecuaristas. Diante dessa situação, muitos proprietários optam por interromper o uso de determinados inseticidas para empregar drogas de mais amplo espectro, notadamente os endectocidas na expectativa de obter uma maior produtividade do rebanho.

Neste cenário, um aspecto que se torna relevante é a possibilidade de comprometer a estabilidade e a sustentabilidade dos ecossistemas, por causa dos possíveis impactos ambientais determinados pelo uso de produtos de amplo espectro. O retardo na decomposição do esterco pela redução da fauna coprófaga (8) e a possibilidade de indução de resistência em outras espécies de parasitas, como nematódeos, carrapatos e outras moscas, pela inadvertida exposição a esses produtos, destacam-se entre os impactos adversos decorrentes dessa prática (9).

Tendo em vista os aspectos acima abordados, o presente estudo foi delineado com o objetivo de avaliar comparativamente a eficácia de seis formulações de parasiticidas no controle do parasitismo natural de bovinos por larvas de *D. hominis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 48 fêmeas da raça Nelore de rebanho comercial de produção de matrizes, localizado no município de Avaré, SP (Longitude – 48° 55' / Latitude – 23° 6'). Os animais eram mantidos em regime de pasto com suplementação mineral em cochos e, no início dos experimentos, todos se encontravam naturalmente infestados com número variável de larvas de *D. hominis* em diferentes estágios de desenvolvimento (Tabela 1). Os experimentos foram realizados no período de outubro a janeiro, época em que de acordo com Pinto et al. (10) ocorre a maior incidência do parasitismo. Vinte e quatro horas antes do início dos experimentos, todos os animais foram pesados e examinados para a contagem do número de nódulos subcutâneos. Após esta contagem, os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais de oito animais.

A escolha dos produtos testados foi baseada no histórico de uso de produtos bernicidas na propriedade. Desta forma foram avaliados Triclorfon, DDVP e a combinação de Cipermetrina/Butóxido de Piperonila, que de acordo com as informações do responsável técnico eram as drogas cujo desempenho não estaria proporcionando um controle adequado das infestações. Os parasiticidas considerados eficazes foram drogas a base de Ivermectina e Doramectina que haviam sido introduzidas na propriedade a fim de se obter um controle mais efetivo das infestações.

Dessa forma, após serem distribuídos em grupos, os animais foram tratados com os seguintes princípios nas respectivas dosagens e vias de aplicação:

- Grupo 1- Triclorfon (Neguvon[®]) – solução a 10% aplicada na proporção de 1 mL para cada 4 kg de peso vivo, na linha do dorso (“pour-on”).
- Grupo 2- DDVP (Bernilene[®]) – solução a 0,15% (15 mL/10 L) aplicada por meio de pulverizador costal na proporção de 1,5 L/animal.

- Grupo 3- Cipermetrina + Butóxido de Piperonila (Cythal[®]) – solução a 0,1% (10 mL/10 L) aplicada por meio de pulverizador costal na proporção de 4 a 5 L/animal.
- Grupo 4- Ivermectina 1% (Ivergen[®]) – aplicado por via subcutânea na dose de 0,2 mg/kg de peso vivo.
- Grupo 5- Doramectina 1% (Dectomax[®]) – aplicado por via subcutânea na dose de 200 mcg/kg (1 mL/kg) de peso vivo.
- Grupo 6- Doramectina 1% (Dectomax[®]) – aplicado por via subcutânea na dose de 50 mcg/kg (250 µL/kg) de peso vivo.

Todos os animais foram examinados aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após o tratamento (DPT) para a contagem do número de nódulos. As contagens foram realizadas com os animais sob contenção e os nódulos foram examinados e contados em ambos os lados de cada animal (6). Em virtude da impossibilidade de se precisar a viabilidade das larvas presentes no interior dos nódulos remanescentes logo após o tratamento, todos os nódulos foram incluídos nas contagens.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância de dois fatores (tratamento e tempo) com medidas repetidas e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Todas as análises foram feitas empregando-se o software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.).

RESULTADOS

A contagem dos nódulos realizada antes do tratamento revelou que os locais mais intensamente parasitados foram a região escapular, o dorso e a região costal dos bovinos com variação de 5 a 92 nódulos/animal (média = 27). O total de nódulos contados no lado direito (704) do corpo dos animais foi maior que o do lado esquerdo (593). No entanto, a análise estatística revelou não haver diferença significativa ($p>0,05$) entre o número médio de larvas instaladas do lado direito (28,7) e esquerdo (24,2) dos animais.

O número de larvas de *D. hominis* antes do tratamento e nas seis semanas subsequentes está apresentado na tabela 1, de acordo com os grupos experimentais. O grupo que apresentou menor contagem tinha um total de 158 nódulos e o que apresentava a maior infestação, 262 nódulos. A média do número de nódulos nos 6 grupos experimentais antes do tratamento não revelou diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 1. Número (média) de nódulos de *D. hominis* em seis grupos de fêmeas nelores antes e após o tratamento com seis diferentes formulações de inseticidas.

Grupos*	Número (média) de nódulos/semana						
	0	1 [#]	2	3	4	5	6
1	262 (29)	87 (9,8)	22 (2,7)	45 (5,3)	174 (19,8)	272 (30,8)	320 (36,2)
2	158 (20)	36 (4,5)	10 (1,3)	13 (1,6)	69 (8,6)	144 (18)	276 (34,5)
3	199 (24,9)	53 (6,6)	23 (2,9)	43 (5,4)	140 (17,5)	258 (32,3)	304 (38)
4	184 (23)	0 (0)	7 (0,9)	2 (0,3)	0 (0)	3 (0,4)	117 (14,6)
5	236 (29,5)	7 (0,9)	2 (0,3)	9 (1,1)	5 (0,6)	27 (3,4)	208 (26)
6	258 (32,3)	3 (0,4)	0 (0)	2 (0,3)	0 (0)	0 (0)	38 (4,8)

*1- Triclorfon 10% (1 mL/4 kg de peso vivo); 2 - DDVP 0,15% (1,5 L/animal); 3 - Cipermetrina + Butóxido de Piperonila 0,1% (4 a 5 L/animal); 4 - Ivermectina 1% (0,2 mg/kg de peso vivo); 5 - Doramectina 1% (200 mcg/kg de peso vivo); 6 - Doramectina 1% (50 mcg/kg de peso vivo).

diferenças significativas em relação à semana 0 para todos os grupos ($p<0,01$) e ausência de diferença entre os grupos ($p>0,05$).

Uma semana após o tratamento foi constatada redução significativa no número de nódulos de *D. hominis* em todos os grupos de animais ($p < 0,01$). Nos animais do grupo 4 a redução foi de 100%, seguida dos animais do grupo 6 (98,8%), 5 (97%), 2 (77,2%), 3 (73,3%) e 1 (66,8%). As análises estatísticas realizadas para comparar a eficácia imediata dos seis tratamentos utilizados revelaram não haver diferença significativa entre eles ($p > 0,05$).

A dinâmica da infestação por larvas de *D. hominis* antes e após o tratamento com cada um dos princípios ativos em suas respectivas concentrações está apresentada na figura 1. Após o tratamento, o ressurgimento de nódulos com larvas em seu interior, indicativo de reinfestação, foi observado na terceira semana no grupo 1 e 3; na quarta semana no grupo 2; na quinta semana no grupo 5 e na sexta semana no grupo 6 (fig. 1). As análises estatísticas destes dados revelaram que as diferenças observadas ao longo do tempo não são significativas ($p > 0,05$).

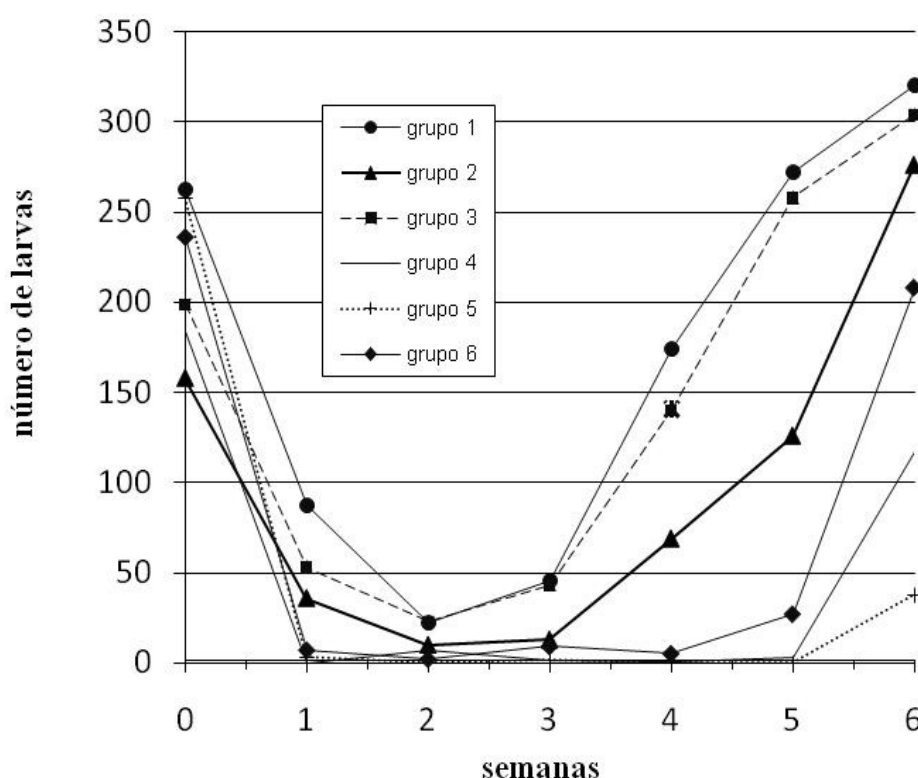


Figura 1. Dinâmica das infestações por larvas de *D. hominis* em seis grupos de fêmeas nelores antes e após o tratamento as seguintes formulações inseticidas: 1- Triclorfon 10% (1 mL/4 kg de peso vivo); 2 - DDVP 0,15% (1,5 L/animal); 3 - Cipermetrina + Butóxido de Piperonila 0,1% (4 a 5 L/animal); 4 - Ivermectina 1% (0,2 mg/kg de peso vivo); 5 - Doramectina 1% (200 mcg/kg de peso vivo); 6 - Doramectina 1% (50 mcg/kg de peso vivo).

DISCUSSÃO

A suspeita inicial de desenvolvimento de resistência aos antiparasitários baseia-se na percepção de diminuição de eficácia dos produtos em controlar determinada peste. Por isso, antes de tudo é necessário verificar se as falhas não estão relacionadas a outros fatores como, por exemplo, a utilização inadequada dos produtos (11). No caso dos inseticidas a

primeira etapa da investigação consiste na verificação de diminuição de susceptibilidade da população a ser controlada (12). No presente trabalho, para esta etapa inicial, optou-se pelo teste de eficácia a campo, empregando animais naturalmente infestados. Com isso, a época para a realização dos experimentos foi escolhida tendo por base as informações de médicos veterinários e de pecuaristas da região, uma vez que não se dispõem de estudos sobre a distribuição sazonal das infestações por larvas de *D. hominis* na localidade estudada. Além disso, dados obtidos em regiões com clima semelhante indicavam que as maiores infestações nos bovinos ocorrem nos meses de setembro a dezembro (10, 13). O número expressivo de larvas de *D. hominis* encontrado nos animais de todos os grupos, tanto no momento do tratamento como nas 6 semanas subsequentes, revelou que o período utilizado para esta avaliação foi adequado.

Quanto aos parasiticidas avaliados, os pertencentes ao grupo dos organofosforados incluíam o triclorfon e o DDVP. Apesar de seu pequeno efeito residual, o triclorfon se destaca por ser o princípio ativo mais utilizado para o controle de infestações por larvas de *D. hominis* em pequenas propriedades no Brasil (7), em função de sua eficácia e do baixo custo. Quanto ao DDVP, o próprio nome comercial do produto, Bernilene[®], já alude à sua indicação para o controle de *Dermatobia*. A cipermetrina e o butóxido de piperolina são piretróides sintéticos utilizados em combinação para aumentar a eficácia inseticida pelo sinergismo dos dois princípios ativos. Com relação às lactonas macrocíclicas (LM), são consideradas as drogas mais potentes para o combate ao berne. Doses de 200 mcg/kg de peso vivo tanto de ivermectina, abamectina, como de doramectina são consideradas altamente eficazes no controle de todos os estágios de *D. hominis* (7).

Nas infestações por dípteros, pondera-se que a eficácia dos produtos deve situar-se entre 80 e 100%, preferencialmente acima de 90% (14). Assim sendo, esta indicação de eficácia foi adotada como parâmetro no presente trabalho.

No presente trabalho, a eficácia dos produtos organofosforados e da combinação de cipermetrina com butóxido de piperonila avaliada aos 7 DPT revelou redução do número de nódulos de *D. hominis* inferior a 80%. No entanto, após 14 dias, o número de nódulos nos animais destes 3 grupos (1, 2 e 3) decresceu, alcançando, no caso dos organofosforados, redução superior a 90%. Como todos os nódulos presentes nos animais foram incluídos nas contagens, pode-se suspeitar que parte dos nódulos contabilizados aos 7 DPT continhasse larvas inviáveis que ainda não haviam sido expelidas. Porém, não é possível descartar a possibilidade de que alguns destes nódulos continhasse larvas que sobreviveram ao tratamento e que se desprenderam após completaram o desenvolvimento larval para pupar. Isto porque, pelo menos no que se refere aos piretróides (grupo 3), é sabido que têm pouca ação letal contra o segundo e terceiro estágio de larvas de *D. hominis* (7).

Ainda no que se refere à eficácia imediata (determinada uma semana após o tratamento), apenas os produtos da classe das lactonas macrocíclicas (Ivermectina e Doramectina) promoveram redução acima de 90% conforme indicado para o controle de dípteros (14). Estes elevados níveis de eficácia das lactonas macrocíclicas contra o berne são comparáveis aos registrados para outras miíases (15). No caso da Doramectina, esta eficácia se manteve mesmo quando a dose utilizada foi 4 vezes menor que a indicada pelo fabricante. A eficácia de “microdoses” das avermectinas tem sido destacada como uma característica no controle de outras miíases como *Hypoderma* em bovinos (16) e *Przhevalskiana* em caprinos (17).

Não obstante estas constatações relativas às LM, quando comparadas estatisticamente, a eficácia imediata de todas as drogas não apresentou diferenças significativas e, portanto, pode-se concluir que todos os tratamentos foram eficazes em produzir redução significativa no número de nódulos de *D. hominis*. De maneira

semelhante, ao longo das seis semanas de observação, a eficácia residual de todos os produtos utilizados não revelou diferenças significativas.

O parasitismo por larvas de *D. hominis* tem sido percebido por criadores de bovinos da raça Nelore como um problema expressivo tanto pela frequência como pela intensidade com que os animais são acometidos. No presente trabalho, os animais apresentavam-se visivelmente irritados e constantemente se debatiam na tentativa de se aliviarem do incômodo provocado pelas larvas. A intensidade com que animais da raça Nelore são parasitados por larvas de *D. hominis* contrasta com o elevado grau de resistência que apresentam às infestações por carrapatos (18) e aos nematódeos gastrintestinais (19). Assim sendo, muito frequentemente, a aplicação de drogas antiparasitárias em animais desta raça é feita com o único objetivo de se controlar o parasitismo por larvas de *D. hominis*.

Tendo em vista estas afirmações e o fato de não ter sido constatada qualquer diferença significativa na eficácia das drogas avaliadas para o controle da dermatobiose outros parâmetros merecem consideração para a escolha dos produtos a serem utilizados. Assim, o custo dos produtos, a facilidade de aplicação, os efeitos tóxicos sobre os animais e tratadores e os efeitos colaterais das drogas contra outros organismos presentes no ambiente, devem ser destacados.

Em relação aos custos, as LM são de três a quatro vezes mais caras que os produtos OP (20). Outro aspecto negativo relevante, em relação às LM, diz respeito aos possíveis efeitos sobre os invertebrados que constituem a fauna coprófila. Quando administradas nas dosagens recomendadas, cerca de 80% da dose das LM é excretada de forma não alterada nas fezes dos animais (21, 22), podendo por pelo menos um mês, afetar de forma adversa a sobrevivência de organismos tais como insetos coprófagos (23, 24). Outra preocupação que se deve ter com o uso das LM é a possibilidade de indução de resistência aos nematódeos intestinais e aos carrapatos principalmente em animais naturalmente resistentes a estes organismos, como é o caso de bovinos da raça Nelore.

A despeito destes inconvenientes, as LM constituem produtos de grande popularidade em função da baixa toxicidade que apresentam para os mamíferos e da fácil aplicação, especialmente se comparado aos organofosforados. Outro dado que faz com que muitos proprietários optem pelas LM é a percepção empírica de sua maior eficácia. No presente trabalho, este aspecto pode ser claramente evidenciado. Aos vinte e oito dias pós-tratamento, nos bovinos dos grupos 1 (Triclorfon) e 3 (Cipermetrina + Piperonila) o número total de nódulos já era superior a 100 e nos animais do grupo 2 (DDVP) de 69 nódulos; enquanto isso, os animais do grupo 5 (Doramectina - 200 mcg/kg) tinham apenas 5 nódulos e os animais dos grupos 4 (Ivermectina 1%) e 6 (Doramectina - 50 mcg/kg) ainda não apresentavam nódulos. Embora estas diferenças não sejam estatisticamente significativas, a percepção empírica é a de que o poder residual das LM foi mais expressivo.

A impressão de tratadores e pecuaristas, de que o parasitismo dos animais tratados com as LM é muito mais prontamente reduzido e duradouro que o obtido com os outros princípios ativos avaliados, faz com que suspeitem de resistência em relação a estes produtos. No entanto, no presente trabalho, as análises estatísticas dos dados não ratificam esta suspeita. Uma possível explicação para esta divergência pode se dever ao fato de que na apreciação empírica o parasitismo é avaliado considerando individualmente cada um dos animais, enquanto que as análises estatísticas avaliam diferenças entre médias.

Contrabalançando os inconvenientes e benefícios relativos ao uso das LM no controle de larvas que causam miíases, alguns pesquisadores têm investigado a possibilidade de, neste caso, utilizar as LM em doses inferiores às recomendadas para o controle de helmintos e carrapatos. De acordo com Boulard et al. (20), o controle da

hipodermose com baixas dosagens de LM tem a vantagem de manter a eficácia com redução dos custos e dos efeitos colaterais negativos sobre o meio ambiente. Estes autores destacaram ainda que a eficácia da utilização das LM em baixas dosagens foi preponderante na decisão do Ministério da Agricultura da França para incluir esta estratégia na elaboração do plano nacional de controle integrado da hipodermose.

No presente trabalho, a utilização de Doramectin em dose quatro vezes menor revelou eficácia imediata e residual comparável à obtida com a dosagem recomendada pelo fabricante, sugerindo assim ser uma alternativa para o controle das infestações por *D. hominis* quando este é o único parasitismo a ser controlado. Como se trata de uma única experiência, mais estudos serão necessários para se estabelecer a conveniência desta alternativa, inclusive para se determinar as épocas mais propícias para o tratamento estratégico das infestações.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Mirtes Costa do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp, pela colaboração nas análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

1. Hall M, Wall R. Myiasis of humans and domestic animals. *Adv Parasitol.* 1995; 35:257-334.
2. Guimarães JH, Papavero N. Myiasis in man and animals in the neotropical region. *Bibliography database.* São Paulo: Plêiade/Fapesp; 1999.
3. Catts EP. Biology of new world bot flies. *Cuterebridae. Annu Rev Entomol.* 1982; 27:313-38.
4. Sancho E. Dermatobia, the neotropical warble fly. *Parasitol Today.* 1988;4:242-6.
5. Grisi L, Massard CL, Moya-Borja GE, Pereira JB. Impacto econômico das principais ectoparasitas em bovinos no Brasil. *Hora Vet.* 2002;21:8-10.
6. Muniz RA, Cerqueira-Leite R, Coronado A, Soraci O, Umehara O, Moreno J, et al. Efficacy of injectable doramectin in the therapy and control of *Dermatobia hominis* infestations in Latin America. *Vet Parasitol.* 1995;60:265-71.
7. Moya-Borja GE. Erradicação ou manejo integrado das miíases neotropicais das Américas? *Pesqui Vet Bras.* 2003;23:131-8.
8. Bang HS, Lee JH, Na YE, Wall R. Reproduction of the dung beetle *Copris tripartitus* in the dung of cattle treated topically with high cis-cypermethrin and chlorpyrifos. *Appl Soil Ecol.* 2007;35:546-52.
9. Wall R. Ectoparasites: future challenges in a changing world. *Vet Parasitol.* 2007; 148:62-74.
10. Pinto SB, Soccol VT, Vendruscolo E, Rochadelli R, Ribeiro PB, Freitag A, et al. Bioecologia de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) em Palotina, Paraná, Brasil. *Cienc Rural.* 2002;32:821-7.

11. Chauve C. The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Vet Parasitol.* 1998;9:239-45.
12. Brogdon WG, Mcallister JC. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis.* 1998;4:605-3.
13. Fernandes NLM, Thomaz-Soccol V, Pinto SB, Oliveira CAL. Populational dynamic and corporal distribution of the larvae *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr. 1788) in bovines of Nelore race. *Arch Vet Sci.* 2008;13:85-92.
14. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use - CVMP. Demonstration of efficacy of ectoparasiticides. Working party on the efficacy of veterinary medicines or products. Notes for guidance. Brussels: Commission of the European Communities; 1993. Document n° III/3682/92-EN.
15. Colwell DD, Otranto D, Stevens JR. Oestrid flies: eradication and extinction versus biodiversity. *Trends Parasitol.* 2009;25:500-4.
16. Hassan MU, Khan MN, Abubakar M, Waheed HM, Iqbal Z, Hussain M. Bovine hypodermosis-a global aspect. *Trop Anim Health Prod.* 2010;42:1615-25.
17. Giangaspero A, Alvinerie M, Traversa D, Paoletti B, Lespine A, Otranto D, et al. Efficacy of injectable and pour-on microdose ivermectin in the treatment of goat warble fly infestation by *Przhevalskiana silenus* (Diptera, Oestridae). *Vet Parasitol.* 2003;30:333-43.
18. Regitano LL, Ibelli AM, Gasparin G, Miyata M, Azevedo AL, et al. On the search for markers of tick resistance in bovines. *Dev Biol.* 2008;132:225-30.
19. Oliveira MC, Alencar MM, Chagas AC, Giglioti R, Oliveira HN. Gastrointestinal nematode infection in beef cattle of different genetic groups in Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;23:249-54.
20. Boulard C, Argente M, Argente G, Languille J, Paget L, Petit E. A successful, sustainable and low cost control-programme for bovine hypodermosis in France. *Vet Parasitol.* 2008;158:1-10.
21. Mc Kellar QA. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Vet Parasitol.* 1997;72:413-35.
22. Strong L, Wall R, Woolford D, Djeddour D. The effects of faecally excreted ivermectin and fenbendazole on the insect colonisation of cattle dung following the oral administration of sustained-release boluses. *Vet Parasitol.* 1996;62:253-66.
23. Suarez VH. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. *Vet Res.* 2002;33:563-73.

24. Floate KD, Wardhaugh KG, Boxall AB, Sherratt TN. Fecal residues of veterinary parasiticides: nontarget effects in the pasture environment. *Annu Rev Entomol.* 2005; 50:153-79.

Recebido em: 12/11/2012

Aceito em: 18/03/2014

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO DE SÊMEN REFRIGERADO DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR E QUARTO DE MILHA*

Marcel Cavalcanti Farrás¹
Eduardo Gorzoni Fioratti²
Carlos Ramires Neto³
Marcio Teoro do Carmo⁴
Rogério Antônio de Oliveira⁵
Frederico Ozanan Papa⁶
José Nicolau Próspero Puoli Filho⁷
Marco Antônio Alvarenga⁶

RESUMO

Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de prolongar a longevidade espermática por meio da refrigeração ou criopreservação do sêmen equino e com isso melhorar as taxas de fertilidade. Muitas dessas pesquisas têm como objetivo desenvolver diluidores, aditivos, curvas e protocolos de refrigeração, assim como tempos e temperaturas de estocagem que garantam a motilidade e integridade do sêmen equino submetido à refrigeração e com isso índices de fertilidade melhores e menos variáveis. Nos últimos anos, houve um aumento considerável na utilização de sêmen equino refrigerado, principalmente devido à aceitação de grande parte das associações de criadores de cavalos. A raça Mangalarga Marchador, de origem nacional, tem se mostrado extremamente sensível ao processo de manipulação, refrigeração e transporte de sêmen. Como em outras espécies de produção, o sucesso da inseminação artificial nos equinos depende da manutenção da viabilidade e fertilidade do sêmen durante o armazenamento. Além disso, quanto maior o tempo ao qual se mantém o potencial fertilizante do sêmen refrigerado, maior flexibilidade terá o médico veterinário para coletar e enviar o sêmen aos haras em que as éguas se encontram, resultando num maior êxito da técnica. O presente experimento teve por objetivo comparar as raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM) quanto à resistência à refrigeração em duas temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado (5°C e 15°C). Os resultados deste trabalho demonstraram que não houve diferença entre as temperaturas de armazenamento (5°C e 15°C), mostrando que ambas são eficientes na manutenção da viabilidade espermática pelo período de 24 horas para ambas as raças estudadas. Além disso, foi observada uma característica espermática superior dos garanhões da raça Quarto de Milha quando comparada aos da raça Mangalarga Marchador, tanto nos parâmetros de velocidade espermática, avaliado pelo CASA, revelando uma maior sensibilidade dos animais da raça Mangalarga ao processo de refrigeração do sêmen.

Palavras-chave: garanhão, sêmen refrigerado, Mangalarga Marchador e Quarto de Milha

* Entidade Financiadora: FAPESP (2009/06835-1; 2010/09387-7)

¹ Mestrando do Departamento de Reprodução da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu, mcfvet@hotmail.com (Correio)

² Doutorando do Departamento de Reprodução da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu

³ Aluno de graduação da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu

⁴ Pós-doutorando do Departamento de Reprodução da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu

⁵ Professor do Departamento de Bioestatística do IBB, Unesp, Campus de Botucatu

⁶ Professor do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu

⁷ Professor do Departamento de Produção Animal da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu

COMPARISON OF DIFFERENCES STORAGE TEMPERATURES IN COOLING SEMEN OF MANGALARGA MARCHADOR AND QUARTER HORSES STALLIONS

ABSTRACT

Studies have been conducted in order to prolong sperm longevity using cooling or frozen-thawed equine semen and in that way improve fertility rates. Many of these studies have focused on developing extenders, additives, cooling curves and protocols, as well as storage times and temperatures to ensure the integrity and motility of equine semen exposed to cooling. Recent years have increased the use of cooled equine semen, mainly due to the acceptance of the horse breeders associations. The Brazilian breed called "Mangalarga Marchador" has proven to be extremely sensitive to the cooling semen. As in other species, the success of artificial insemination in horses depends on maintaining the viability and fertility of semen during storage. Moreover, the longer you keep the cooling semen fertilizing potential, more flexibility will have the veterinarian to collect and send the semen samples, resulting in higher technique success. The aim of this study was to compare breeds Mangalarga Marchador (MM) and Quarter Horses (QM) for resistance to cooling in two semen storage systems (5°C and 15°C). The results showed no difference between the storage temperatures (5°C and 15°C), showing that both are effective in maintaining sperm viability for a period of 24 hours for both breeds studied. In addition, we observed superior sperm characteristics for Quarter Horse stallions when compared to the Mangalarga Marchador, evaluated by CASA, revealing a higher sensitivity for the cooling process by Mangalarga Marchador stallions.

Keywords: stallion, cooled semen, Mangalarga Marchador e Quarter Horse

COMPARACIÓN DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO DE SEMEN REFRIGERADO DE CABALLOS MANGALARGA MARCHADOR Y CUARTO DE MILLA.

RESUMEN

Últimamente, varios estudios se han realizado con el fin de prolongar la longevidad de los espermatozoides mediante refrigeración o criopreservación del semen equino y de esa manera mejorar las tasas de fecundidad. Muchos de estos estudios se han centrado en los diluyentes, aditivos, curvas de enfriamiento y protocolos, así como los tiempos y temperaturas de almacenamiento para garantizar la integridad y la motilidad del semen equino expuestos al enfriamiento. En los últimos años han aumentado el uso de semen refrigerado equino, principalmente debido a la aceptación de las asociaciones de criadores de caballos. La raza brasileña "Mangalarga Marchador" ha demostrado ser extremadamente sensible a la refrigeración del semen. Como en otras especies, el éxito de la inseminación artificial en los caballos depende del mantenimiento de la viabilidad y fertilidad del semen durante el almacenamiento. Por otra parte, cuanto más tiempo se mantenga el potencial fertilizante, más flexibilidad tendrá el veterinario para coleccionar y enviar las muestras de semen, lo que resulta en mejores resultados de la técnica. El objetivo de este estudio fue comparar las razas Mangalarga Marchador (MM) y Caballos Cuarto de Milla (CM) para la resistencia a la refrigeración en dos temperaturas de almacenamiento de semen (5°C y 15°C). Los resultados no mostraron diferencia entre las temperaturas de almacenamiento (5°C y 15°C), mostrando que ambos son efectivos en el mantenimiento de la viabilidad espermática por un período de 24 horas para ambas las razas estudiadas. Además, se observó características espermáticas

superiores de los sementales Cuarto de Milla en comparación con los Mangalargas Marchadores, evaluada por CASA, indicando una mayor sensibilidad para el proceso de refrigeración para la raza Mangalarga Marchador.

Palabras clave: semental, semen refrigerado, Mangalarga Marchador y Cuarto de Milla

INTRODUÇÃO

Atualmente, a comercialização e o transporte de sêmen, tanto refrigerado como congelado, se tornaram uma das atividades mais frequentes dentre as realizadas pelas centrais de reprodução equina no Brasil. Não só devido à aceitação das associações de criadores de cavalos, como também ao desenvolvimento de novas tecnologias permitindo com que o sêmen seja transportado da propriedade em que o garanhão se encontra até a propriedade em que a égua está alojada (1). O fato de se transportar o sêmen até as éguas, ao invés de transportá-las até o garanhão oferece inúmeras vantagens, como a eliminação de gastos com transporte, a diminuição do estresse animal, a diminuição dos riscos impostos aos potros e as próprias matrizes de possíveis acidentes e de adquirir doenças, como resultado da exposição a patógenos em seu novo ambiente, além, destas propriedades serem, na grande maioria, distantes e dispenderem altos custos com a hospedagem dos animais (2). O armazenamento do sêmen em baixas temperaturas tem como objetivo prolongar a viabilidade espermática por reduzir o consumo de energia (3). Porém, durante o processo de redução de temperatura, ocorre reorganização nos lipídeos da membrana plasmática, e a formação de alguns subprodutos indesejáveis o que acarreta diretamente na diminuição da longevidade dos espermatozoides (4). A raça Mangalarga Marchador, de origem nacional, tem se mostrado extremamente sensível ao processo de manipulação, refrigeração e transporte de sêmen diferentemente de garanhões das raças Quarto de Milha, Brasileiro de Hipismo e outras de origem internacional (5). O objetivo deste estudo foi comparar a resistência do sêmen refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador (MM) com indivíduos da raça Quarto de Milha (QM), e definir qual a melhor temperatura de armazenamento de sêmen para os cavalos destas raças.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente experimento avaliou duas temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado, 5°C e 15°C, de garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM) quanto aos padrões de velocidade computadorizada e integridade de membrana.

Animais

Foram utilizados dois ejaculados de 27 garanhões (n=54 ejaculados), com idade entre 4 e 12 anos, sendo 11 da raça Mangalarga Marchador (MM) e outros 16 da raça Quarto de Milha (QM).

Colheita dos Ejaculados

A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial. Foi empregada a metodologia da colheita fechada, com a temperatura da vagina artificial em torno de 45°C. Para que o garanhão efetuasse a monta, utilizou-se de uma égua no cio, devidamente contida, ou de manequim próprio para a monta de garanhões.

Processamento do Sêmen

Após a colheita dos ejaculados, estes foram filtrados, para que fosse descartada a fração gel, o volume mensurado em proveta graduada e uma alíquota do sêmen foi separada para avaliação da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), percentual de espermatozoides rápidos (RAPID) pela análise computadorizada (CASA - Hamilton Thorn – HTMIVOS 10), bem como a integridade de membrana plasmática (Iodeto de Propídeo), integridade acrossomal (FITC-PSA) e potencial mitocondrial (JC-1) segundo Celeghini et al. (6). A avaliação da concentração espermática foi realizada em microscópio de luz (200x) com auxílio de uma câmera de Neubauer após diluição de 10 μ L de sêmen em 190 μ L de água destilada (1:20).

Após análise, o sêmen foi diluído em meio comercial (Botusemen[®]), em proporções que variaram de 2:1 a 5:1 a fim de se conseguir uma concentração de 50x10⁶ spz/mL e então se iniciou o processo de refrigeração nas caixas térmicas conhecidas por Botutainer[®] (5°C) e Botubox[®] (15°C). As análises foram realizadas nos momentos 0, após 12 e 24 horas de refrigeração.

Análise Estatística

Para cada variável avaliada, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de um delineamento em blocos, sendo cada animal considerado um bloco e os tratamentos no esquema fatorial com os fatores: raça, caixas térmicas, tempo de armazenamento e ejaculado. A comparação entre as médias dos níveis de cada fator foi realizada pelo teste de Tukey, com nível de 5% de significância.

RESULTADOS

As temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado (5°C e 15°C), avaliados independentemente do fator raça, não demonstraram qualquer diferença em todos os parâmetros avaliados, conforme pode ser observado nas tabelas de 1 a 5.

Ao se comparar as raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha, independente dos sistemas e tempo de armazenamento observou-se diferença estatística (P<0,05) favorável à raça Quarto de Milha, para os parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP) e percentual de espermatozoides rápidos (RAPID), conforme descrito nas Tabelas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Com relação à integridade das membranas não foi encontrada diferença (P>0,05) nos subtipos celulares que apresentavam membrana plasmática e acrossomal íntegra, com alto potencial mitocondrial (PIAIA) (Tabela 5).

Ao se avaliar somente o tempo em que o sêmen foi acondicionado nos dois sistemas de armazenamento, observou-se que a motilidade total (Tabela 1) e o percentual de espermatozoides rápidos (Tabela 4) apresentaram diferença em todos os momentos avaliados, ou seja, conforme esperado o sêmen no momento 0 apresentou melhores resultados que o sêmen armazenado por um período de 12 horas, que por sua vez se apresentou melhor que o acondicionado por um período de 24 horas.

A motilidade progressiva (Tabela 2) e o VAP (Tabela 3) mostraram um mesmo comportamento com relação ao tempo. Em ambos os casos, o sêmen no momento 0 não mostrou diferença (P>0,05) do sêmen refrigerado no momento 12 horas, porém foi diferente do refrigerado no momento 24 horas (P<0,05). Em contrapartida, o sêmen refrigerado por 12 horas não mostrou diferença do armazenado por 24 horas (P>0,05).

Quando da avaliação da integridade das membranas espermáticas, os subgrupos celulares PIAIA foram diferentes no momento 0 ($P < 0,05$) quando comparado ao sêmen armazenado por 12 e por 24 horas nos sistemas de armazenamento de sêmen refrigerado.

Tabela 1. Média e Desvio Padrão (%) da Motilidade Total (MT) dos ganhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^b	24 ^c
MT	MM	5 ^A	75,00±12,08	65,17±18,86	55,72±24,18
		15 ^A	75,00±12,08	67,17±14,20	58,61±26,06
	QM	5 ^B	80,44±8,39	76,81±10,81	72,72±13,52
		15 ^B	80,44±8,39	76,97±11,82	73,22±14,54

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes.

Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Conforme demonstrado na Tabela 1, não foi observada diferença estatística ($P > 0,05$) com relação às temperaturas de armazenamento. Porém pode-se verificar diferença estatística ($P < 0,05$), com superioridade da raça Quarto de Milha, no parâmetro de motilidade total. Os tempos de armazenamento foram diferentes no momento 0, 12 e 24 horas de refrigeração.

Tabela 2. Média e Desvio Padrão (%) da Motilidade Progressiva (MP) dos ganhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^{ab}	24 ^b
MP	MM	5 ^A	32,50±11,21	28,72±14,93	25,00±18,64
		15 ^A	32,50±11,21	26,28±12,03	22,17±16,07
	QM	5 ^B	41,84±11,84	41,81±13,17	39,69±14,49
		15 ^B	41,84±11,84	38,81±13,92	34,47±14,35

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) na motilidade progressiva (MP) entre as raças estudadas, com superioridade para os animais da raça Quarto de Milha. Entre as temperaturas de armazenamento não houve diferença ($P > 0,05$). Em relação aos tempos de armazenamento não houve diferença ($P > 0,05$) entre o sêmen no momento 0 e o armazenado por 12 horas e entre os tempos de 12 e 24 horas, porém houve diferença ($P < 0,05$) entre os momentos 0 e 24.

Tabela 3. Média e Desvio Padrão da velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), medida em $\mu\text{m/s}$ pelo HTMA, dos ganhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^{ab}	24 ^b
VAP	MM	5 ^A	132,83±19,31	113,89±28,54	108,67±36,63
		15 ^A	132,83±19,31	121,00±22,89	106,78±39,21
	QM	5 ^B	130,06±19,51	127,02±12,27	115,29±19,82
		15 ^B	130,06±19,51	124,81±26,37	122,53±16,32

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Quando avaliada a velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), medida em $\mu\text{m/s}$ pelo CASA, foi observada diferença ($P < 0,05$) entre as raças. As temperaturas de armazenamento não apresentaram diferença ($P > 0,05$). Em relação aos tempos de armazenamento, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os momentos 0 e 12 horas e para os momentos 12 e 24 horas, e houve diferença ($P < 0,05$) entre os momentos 0 e 24, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 4. Média e Desvio Padrão (%) do percentual de espermatozoides rápidos (RAP) dos ganhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^b	24 ^c
RAP	MG	5 ^A	66,94±13,76	55,78±24,22	45,50±23,80
		15 ^A	66,94±13,76	56,44±17,76	49,56±23,79
	QM	5 ^B	74,22±10,61	69,78±12,79	64,34±15,67
		15 ^B	74,22±10,61	69,13±14,93	64,44±17,21

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Observou-se também, conforme demonstrado na Tabela 4, diferença estatística ($P < 0,05$) no percentual de espermatozoides rápidos (RAP) entre as raças, com superioridade dos indivíduos da raça Quarto de Milha. Entre as temperaturas de armazenamento não foi demonstrado diferença ($P > 0,05$). Os tempos de armazenamento foram diferentes em todos os momentos avaliados ($p < 0,05$).

Tabela 5. Média e Desvio Padrão (%) do percentual de espermatozoides que apresentam Membrana Plasmática Inteira, Acrossomo íntegro e Alto potencial mitocondrial (PIAIA) dos ganhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^b	24 ^c
PIAIA	MM	5 ^A	64,06±8,54	50,72±9,86	44,50±12,20
		15 ^A	64,06±8,54	51,78±8,91	42,06±12,20
	QM	5 ^A	57,69±13,13	49,56±12,55	43,91±12,40
		15 ^A	57,69±13,13	52,09±11,36	44,91±11,79

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Conforme demonstrado na Tabela 5, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) na avaliação de integridade de membrana plasmática, potencial mitocondrial e integridade acrossomal para a variável PIAIA (Membrana Plasmática Inteira, Acrossomo Íntegro e Alto Potencial Mitocondrial) entre as raças, assim como nos sistemas térmicos avaliados. Já os tempos de armazenamento foram diferentes ($P < 0,05$) em todos os momentos avaliados.

DISCUSSÃO

O sucesso da preservação espermática, pela refrigeração está diretamente relacionado a fatores como: diluição, curva de refrigeração lenta e temperatura de armazenamento que reduza o metabolismo espermático minimizando os danos à membrana plasmática (7). Squires e Brisko (8) recomendam uma diluição do ejaculado a uma concentração de 25 e 50 x 10⁶

sptz/ml, principalmente pelo fator deletério do plasma seminal sobre o resfriamento e armazenamento do sêmen equino a 5° C.

A utilização das biotecnologias do sêmen, tanto refrigerado como congelado, viabiliza o uso de um reprodutor em momentos nos quais não seria possível a monta natural, devido, principalmente às grandes distâncias encontradas entre o haras em que este se encontra e as propriedades das éguas (1), além disso, com a grande procura do sêmen de alguns garanhões geneticamente superiores, podemos otimizar seu uso pela possibilidade de um ejaculado ser fracionado em várias doses, que podem ser enviadas a distintas regiões do país, além disso, preservamos a saúde destes garanhões, eliminamos os gastos inerentes ao transporte tanto do macho como da fêmea, diminuimos o estresse animal, os riscos do transporte de potros e matrizes de possíveis acidentes e adquirir novas doenças (2), e ainda aumentamos o número de animais a serem acasalados com um determinado reprodutor.

Sabe-se que a capacidade fertilizante, usualmente é associada à qualidade da motilidade e a morfologia espermática (9, 10), porém estas não possuem uma correlação absoluta, dessa forma, pode se dizer que o parâmetro da motilidade é menos preciso do que a real fertilidade das amostras de sêmen para se estimar a viabilidade espermática (11). Assim, buscando uma maior correlação entre as características de movimento e a capacidade fertilizante, Jasko et al. (12) verificaram que a motilidade total, progressiva e velocidade média (VAP) podem prever melhor sobre a fertilidade, demonstrando a importância do uso da análise computadorizada para se obter uma maior acuidade nas avaliações.

O presente experimento teve por objetivo central avaliar e determinar o efeito do processo de refrigeração de sêmen sobre a qualidade espermática. Os indivíduos da raça Mangalarga Marchador mostraram de uma forma geral maior sensibilidade ao processo de refrigeração quando comparado aos da raça Quarto de Milha tanto no armazenamento a 5°C, quanto no de 15°C, nos momentos 12 e 24 horas. Esta maior sensibilidade foi observada nos parâmetros de MT (Tabela 1), MP (Tabela 2), VAP (Tabela 3), RAP (Tabela 4).

No parâmetro motilidade total foram observados valores de aproximadamente 77% para os Quarto de Milha e 67% para os garanhões da raça Mangalarga Marchador no período de 12 horas e de aproximadamente 73% *versus* 57% quando armazenado por 24 horas em ambos os sistemas de armazenamento, ou seja, do momento 0 para o 12 horas e do 12 para o 24 horas, houve uma queda de 10 pontos percentuais para os MM e 4 para os QM em ambos os períodos.

Apesar de a literatura ser omissa na comparação entre raças e sua relação com resistência à refrigeração de sêmen, uma maior sensibilidade dos garanhões da raça Mangalarga foi observada quando comparou sêmen submetido à congelação de garanhões das raças MM, QM e HIPISMO (5). Este mesmo autor verificou que os indivíduos da raça MM foram os menos resistentes, onde somente 11,7% dos garanhões avaliados apresentaram uma MT maior que 40% após o processo de descongelação, enquanto no grupo das raças QM e HIPISMO, 50 e 53,8% apresentaram uma MT maior que 40%.

Uma queda marcante na motilidade progressiva no sêmen refrigerado de cavalos da raça MM foi observada, conforme observado na Tabela 2. Concordando com o estudo de Alvarenga (5) que verificou que 5,8% dos garanhões obtiveram MP>20%, enquanto foi observado 41,6% dos cavalos da raça QM e 30,7% dos garanhões de Hipismo.

Além da MT e MP, o presente estudo demonstrou que a raça MM foi mais sensível ao processo de refrigeração do que a raça Quarto de Milha com relação às velocidades espermáticas e porcentagem de espermatozoides rápidos (Tabela 4).

As temperaturas de armazenamento, 5°C e 15°C, não apresentaram diferenças significativas entre si ($P>0,05$), em todos os parâmetros avaliados para todos os indivíduos tanto dos garanhões da raça MM quanto para os QM, demonstrando que ambos os sistemas de armazenamento de sêmen são adequados para a manutenção das características da qualidade do sêmen, corroborando com os achados de outros pesquisadores (13, 14).

Alguns estudos demonstram que a manutenção da temperatura em torno de 5°C é preferencial a de 20°C (15, 16), ressaltando que o intervalo entre 4-6°C é o mais adequado para a manutenção da motilidade e da fertilidade (17, 18). Avanzi et al. (13) não encontraram diferenças entre os sistemas de armazenamento. Neste trabalho, foram comparadas duas temperaturas de refrigeração a 5°C e 15°C, à temperatura ambiente de 25°C. As características de motilidades total e progressiva, bem como a integridade de membrana não foram afetadas pela temperatura de armazenamento, assim como em outros estudos (14, 19) que não encontraram diferenças quando compararam os sistemas de armazenamento de sêmen a 5°C e 15°C.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados e nas condições em que o experimento foi realizado, pode-se concluir que as temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado equino a 5°C e 15°C são eficientes tanto na manutenção das características de motilidade e integridade de membrana e se comportam de maneira similar por um período de até 24 horas. Além disso, a raça Mangalarga Marchador apresentou uma maior sensibilidade quanto à manutenção da qualidade seminal após refrigeração do sêmen quando comparada à raça Quarto de Milha.

REFERÊNCIAS

1. Squires EL, Brubaker JK, Mccue PM, Pickett BW. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology*. 1998;28:709-18.
2. Brinsko SP, Varner DD. Artificial insemination and preservation of semen. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1992;8:205-18.
3. Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Parsley M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*. 1998;50:535-46.
4. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 2000;53:47-58.
5. Alvarenga MA. Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2003.
6. Celeghini CCC, Arruda RP, Silva FHA, Faria DE, Andrade AFC, Raphael CF. Utilization of fluorescent probe association for membrane simultaneous assessment of plasmatic, acrossomal and mitochondrial membrane of rooster spermatozoa. *Rev Bras Cienc Avic*. 2007;9:143-9.
7. Loomis PR. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: *Proceedings of the 38° Annual Convention of American Association of Equine Practitioners*; 1992, Orlando. Orlando: AAEP; 1992. p.629-47.
8. Squires EL, Brinsko SP. Factors affecting fertility of cooled semen. In: *Proceedings of the Annual Meeting of Equine Nutrition and Physiology Society*; 1997, Fort Worth. Fort Worth: Colorado State University; 1997. p.4-9.

9. Parks J, Graham J. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 1992;38:209-22.
10. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*. 2000;62:3-22.
11. Carvalho GA, Papa FO. Estudo de diferentes diluentes sobre a viabilidade espermática utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim*. 2003;27:332-34.
12. Jasko J, Little TV, Lein DH, Foote RH. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987–1988). *J Am Vet Med Assoc*. 1992;200:979-85.
13. Avanzi BR, Farrás MC, Melo CM, Alvarenga MA, Dell’acqua Jr JA, Medeiros ASL, et al. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. *Anim Reprod Sci*. 2006;94:152-4.
14. Machado MS, Leão KM, Gomes GM, Macedo LP, Alvarenga MA. Efeitos de diferentes sistemas de transporte sobre a qualidade do sêmen refrigerado equino. *Rev Bras Reprod Anim*. 2002;26:194-6.
15. Kayser JP, Amann RP, Shideler EL, Jasko DJ, Pickett BW. Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 1992;38:601-14.
16. Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoa motility parameters. *Theriogenology*. 1988;29:1043-54.
17. Palmer E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: *Proceeding of the 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*; 1984, Illinois. Illinois: USDA; 1984. p.377-9.
18. Squires EL, Amann RP, Mckinnon AO, Pickett BW. Fertility of equine spermatozoa cooled to 5oC or 20oC. In: *Proceedings of the 11° International Congress in Animal Reproduction and Artificial Insemination*; 1988, Dublin. Dublin: University College Dublin; 1988. p.297-9.
19. Farrás MC, Avanzi BR, Melo CM, Dell’Aqua JA, Papa FO. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. *Cienc Anim Bras*. 2008;9:693-9.

Recebido em: 05/02/2012

Aceito em: 12/05/2014

Comitê de Avaliadores

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

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

REVISTA “VETERINÁRIA E ZOOTECNIA”

NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

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

2. Página com resumo, abstract e resumen

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

3. A estrutura do artigo deverá conter:

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

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

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

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

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

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

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

ARTIGOS DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

RELATOS DE CASO

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

COMUNICAÇÕES CURTAS

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

REFERÊNCIAS E CITAÇÕES

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

Exemplos

Citações

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referências

Indique até seis autores seguidos de et al.

1 Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

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

5 Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

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

6 Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos

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

7 Publicações disponíveis na Internet

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

JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE AND ANIMAL SCIENCE

RULES FOR PRESENTATION OF PAPERS

The **Journal of Veterinary Medicine and Animal Science**, from School of Veterinary Medicine and Animal Science - UNESP, Botucatu, publishes original scientific and review papers, case reports and short communications related to Veterinary Medicine and Animal Science with semestral periodicity. The journal is open to national and/or foreign contributions (in English or Spanish) under the author's full responsibility.

Publication is conditioned to preliminary evaluation by the president of the editorial board, that analyses the merit and formal aspects of the work, according to the category of submitted paper and established editorial rules. If adequate, the article is subjected to review by two experts in the field. Opinion of reviewers are kept undisclosed. There are no possibility of identification of authors and reviewers. The articles not accepted will be returned to the authors.

Manuscripts must be submitted at the journal website <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>.

Prof. Helio Langoni

Revista "Veterinária e Zootecnia"

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

SCIENTIFIC PAPERS

Must be prepared according to the following items:

1. Title page:

- Title of the manuscript in Portuguese, English and Spanish, using Times New Roman font 12, simple spacing, bold and centered, with the words in upper case. When necessary, indicate the financial support as first footnote;

- Full authors names, where only the first letter of each name must be in upper case at the right side of the page. The authors' names must be typed separated by line, with numbered superscript **footnotes, which will indicate** the position and author's professional address, followed by the name of the institution where the work was done or to where it is linked;

- Name, address, telephone number, fax and e-mail address for correspondence;

- In case of involvement of human or experimental animals include the Ethics Committee approval or equivalent, and type before the bibliographic references with date of approval.

2. Abstract in Portuguese, English, and Spanish

- The "resumo", abstract and "resumen" must be followed by the title in the respective language and should not exceed 400 words each, with information regarding introduction, methods, results and conclusions. Text must be justified and in a single paragraph, simple spacing, beginning with the "RESUMO". Independent of the paper language, the abstract must be submitted in English, Portuguese and Spanish.

- Must include a maximum of five "palavras-chave", keywords, and palabras claves that identify the text content.

3. The structure of the paper must include:

Introduction: Clearly state the objective of the study with brief overview of the investigated problem and literature review.

Material and Methods: Provide a concise description of the experimental methods, variables, population in study, equipment, as well as the statistics, in sufficient detail to allow other researches to reproduce the results.

Results: The results should be described without interpretation and comparisons. The results may include **tables**, which should come in a separate sheet (maximum of 5 tables) and numbered consecutively in Arabic numerals, with the title on the top, according to the rules of table presentation by ABNT/WBR 6023/2000 from Associação Brasileira de Normas Técnicas, and identified in the text as Table; **figures**, in case of graphs, photographs, drawings, maps, etc, numbered consecutively in Arabic numerals (maximum of six), cited in the text as Figure. **Photographs** may be black and white or color, identified with the author's name in the back. **Original drawings** must be printed in high quality paper.

Discussion: Should be the interpretation of the results, relative to other relevant studies, presented in the introduction. If convenient, the results and discussion may be presented together.

Conclusions: The final synthesis, based on the results and discussion.

References: Should be presented according to Vancouver rules (<http://www.icmje.org/>), and arranged in alphabetical order, by author's last name (examples in the end of the instructions).

Manuscripts **should** be edited in Microsoft Word for Windows, for text, Excel (any version) for graphs, JPEG or GIF format (images) for photographs, drawings and maps, A4 format paper (21,0 x 29,7 cm), double spaced, leaving at least 2,5 cm margins, (lateral, top and bottom of page), Times New Roman font, size 12 and numbered in Arabic numerals, beginning in the identification page. The authors will have to present numeration in the lines, restarting the counting to each new page. Illustrations and legends must be presented on separate sheets.

Reprints will not be offered. The articles will be available in PDF format at the journal website. The same rules apply for all the other sections of the journal. The manuscripts should not exceed 15 pages. Unusual abbreviations should be used only after first time citation.

REVIEW ARTICLES

The review articles will be published in Portuguese, English or Spanish, if it provides scientific contribution that is relevant in the area, when invited by the editors. The review articles must include: Title (Portuguese, English and Spanish), resumo with palavras-chave, abstract with key words and resumen with palabras-claves, introduction, subject overview, conclusion e references. Must contain a maximum of 20 pages and 60 references.

CASE REPORTS

Should not be prepared with the same structure as the articles. The case reports must present the title in Portuguese, English and Spanish, resumo with palavras-chave, abstract with keywords and resumen with palabras claves and references. Must contain a maximum of five pages, three tables or figures and 15 references.

SHORT COMMUNICATIONS

These are reports with new and relevant data of original studies, as preliminary results of a research. Must be presented with a maximum of five pages, one table and ten references. The structure should follow the same rules for case reports.

REFERENCES AND CITATIONS

References should be numbered consecutively in order in which they are first mentioned in the text, tables, and legends by Arabic numbers in parentheses in same sequence. The titles of journals should be abbreviated according to the style *List of Journals Indexed in Index Medicus* available from: <http://www.nlm.nih.gov>.

Examples:

Citations

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram. O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51). O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

References

List the first six authors followed by et al.

1 Journal article

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organization as author

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Book

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Chapter in a book

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

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

5 Conference paper

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

6 Dissertation

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

7 Electronic material on Internet

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

REVISTA “VETERINARIA Y ZOOTECNIA”**NORMAS PARA PRESENTACIÓN DE TRABAJOS**

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

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

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

Prof. Helio Langoni

Revista “Veterinaria y Zootecnia”

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

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

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES**ARTÍCULOS CIENTÍFICOS**

Deben ser estructurados de acuerdo con los siguientes puntos:

1. Página principal, con:

- Título del trabajo en portugués, inglés y en español, tipo de letra Times New Roman, número 12, con espacio entre líneas sencillo, en negrilla y centrado, en letra mayúscula. Cuando sea necesario, indicar la entidad que financia la investigación, como primer pié de página;
- Nombres completos de los autores, en los cuales solamente la primera letra de cada nombre debe ser mayúscula, en lado derecho de la página. Digitalarlos separados un por línea, con **notas de pié** de página numeradas y en sobrescrito, **que indicarán** el cargo y la dirección profesional de los autores, seguidos de la institución donde el trabajo fue realizado o en las cuales están vinculados;
- Nombre, dirección, teléfono, fax y correo electrónico para correspondencia.
- En el caso de involucrar seres humanos o animales de experimentación, enviar el concepto de la Comisión de Ética o equivalente, destacando en el trabajo antes de las referencias y fecha de aprobación, así como el envío de la copia del concepto.

2. Página con resumen en Portugués, Inglés y Español.

- Tanto el “resumo”, como el “abstract”, así como el resumen, deben estar seguidos del título del trabajo, en el idioma respectivo y contener, como máximo 400 palabras cada uno, con informaciones referentes a la introducción, metodología, resultados y conclusiones. El texto debe estar ajustado (justificado) y digitado en un solo párrafo y con espacio entre líneas sencillo iniciando por el “RESUMO”. El “Abstract”, y el Resumen, deben ser fiel traducción del “Resumo”. Independiente da la lengua que el artículo fue presentado deberá contener el resumen en portugués, inglés y español.

- Deben contener como máximo, cinco “palavras-chave” “keywords”, y palabras clave que identifiquen el contenido del texto.

3. La estructura del artículo deberá contener:

Introducción: debe ser clara, objetiva y relacionada al problema investigado, y a la literatura pertinente, así como con los objetivos de la investigación. La introducción establece los objetivos del trabajo.

Materiales y Métodos: debe ofrecer informaciones de reproductibilidad de la investigación, de forma clara y concisa, como variables, población, muestra, equipos, o métodos utilizados, inclusive los estadísticos.

Resultados: Presentación de los resultados obtenidos, que deben ser descritos, sin interpretaciones y comparaciones. Podrá ser bajo la **forma de tablas**, en hojas separadas, con máximo de cinco, ordenadas en algarismos arábigos, y encabezadas por el título, de acuerdo con las normas de presentación tabular de las normas ABNT/WBR 6023/2000 de la Asociación Brasileña de Normas Técnicas, ABNT, identificadas en el texto como Tabla; bajo la **forma de figuras** en los casos de gráficos, fotografías, dibujos, mapas, etc., ordenadas en algarismos arábigos hasta un máximo de seis, y citadas en el texto como Figura. **Fotografías** pueden ser en blanco y negro o a colores; identificadas con el nombre del autor o autores al lado opuesto. En el caso de **dibujos originales**, la impresión debe ser en papel adecuado, de calidad.

Discusión: Debe ser entendida como la interpretación de los resultados, confrontando la literatura pertinente, descrita en la introducción. De ser conveniente los resultados y discusión podrán ser presentados conjuntamente.

Conclusiones: Es la síntesis final, fundamentada en los resultados y en la discusión.

Referencias: Deben ser presentadas de acuerdo con las normas de Vancouver (<http://www.icmje.org/>), y el arreglo organización debe ser en orden alfabético por apellido del autor (modelos anexos al final).

Deberán ser editados en Microsoft Word for Windows, para edición de textos, Excel (cualquier versión) para gráficos, formato JPEG o GIF (imagen) para fotografías, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), a doble espacio, manteniendo márgenes de 2,5 cm, en las laterales, parte superior e inferior de cada página, fuente Times New Roman, número 12 y numeración consecutiva de las páginas en números arábigos, a partir de la hoja de identificación. Deberán presentar también la numeración en las líneas, recomenzando la cuenta a cada página nueva. Ilustraciones y leyendas deben ser presentadas en hojas separadas.

No se ofrecerán separatas. Los artículos estarán disponibles en el formato PDF en la página WEB de la revista. Para las demás secciones de la revista son válidas las normas anteriores. No deben exceder las 15 páginas. Abreviaturas no usuales, deben ser empleadas después de haber sido escritas por extenso en la primera utilización.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los artículos de la revisión bibliográfica serán publicados en los idiomas portugués, inglés y español, cuando el autor presente contribución científica, importante en el área específica del asunto abordado, y por invitación de los editores.

Deberán contener: Título (portugués, inglés y español), resumen con palavras-chave, abstract con keywords e resumen con palabras claves, introducción, desarrollo del tema, conclusión y referencias. Deberán contener como máximo 20 páginas y 60 referencias (citas bibliográficas).

ESTUDIOS DE CASO

No deben ser subdivididos, como para los artículos. Deben presentar el título en portugués, en inglés y español, resumen con palavras-chave, abstract con key words e resumen con palabras-claves y referencias. Deben contener como máximo cinco páginas, tres tablas o figuras y 15 referencias bibliográficas.

COMUNICACIONES CORTAS

Son relatos con datos inéditos y relevantes de estudios originales, como por ejemplo resultados preliminares de una investigación. Deben ser presentados como máximo en cinco páginas, una tabla y 10 referencias bibliográficas. La estructuración debe respetar las normas para estudios de caso.

REFERENCIAS E CITACIONES

Numerar las referencias consecutivamente según el orden en que se mencionen por primera vez en el texto. En éste, en los cuadros y leyendas, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Abreviar los títulos de las revistas según *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponible en: <http://www.nlm.nih.gov>.

Ejemplos

Citations

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referencias

Mencionan los seis primeros autores seguidos de la abreviatura et al.

1 Artículo de periódico

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organización como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Libro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Capítulo en libro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

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

5 Ponencias o conferencias en simposio, congreso, reuniones, etc .

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

6 Tesis

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

7 Medios electrónicos en Internet

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