

Veterinária e Zootecnia

Vet e Zootec.

2013 junho; 20(2): 152-349

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 – Dist. Rubião Júnior – Botucatu – SP - Brasil

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

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

Trimestral
Texto em português/inglês/espanhol
Descrição baseada em: Vol. 20, n.1, mar. (2013)
ISSN Impresso 0102 -5716
ISSN Eletrônico 2178-3764

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

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

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
2013

EXPEDIENTE

Comissão Editorial

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

Assessoria Técnica

Editoração Eletrônica: José Luis Barbosa de Souza, Gabriele Gimenes Pereira e Maria Paula Toldo Tavares

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

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

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

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

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

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

Prof. Dr. Helio Langoni

Revista “Veterinária e Zootecnia”

**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu
18618-970 - Dist. Rubião Junior, s/n – SP – Brasil**

Corpo Editorial

- Alice Eiko Murakami (UEM/Maringá)
Aristeu Vieira da Silva (UEFS/Feira de Santana)
Antônio Felipe P. F. Wouk (UFPR – Escola de Agronomia e Veterinária)
Benedito Correa (ICB – USP)
Carlos Robles (Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária – Argentina)
Edir Nepomuceno da Silva (FEA – UNICAMP)
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 (UFSM/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	159
ARTIGOS DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE/ARTÍCULOS DE REVISIÓN	
COMPLEXO GENGIVITE ESTOMATITE FELINA: REVISÃO DE LITERATURA / FELINE GINGIVITIS-STOMATITIS COMPLEX: A REVIEW / COMPLEJO GINGIVITIS-ESTOMATITES FELINA: REVISIÓN DE LA LITERATURA. Kelly Sanches Matilde, Maria Lúcia Gomes Lourenço, Fabíola Soares Zahn, Luiz Henrique de Araújo Machado.....	160
ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DOS COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS / UTRASTRUCTURAL ASPECTS OF THE CUMULUS-OOCYTE COMPLEXES OF DOMESTIC MAMMALS / ASPECTOS ULTRAESTRUTURALES DE LOS COMPLEJOS CUMULUS-OVOCITOS DE LOS MAMÍFEROS DOMÉSTICOS. Leticia Ferrari Crocomo, Wolff Camargo Marques Filho, Midyan Daroz Guastali, Fernanda Da Cruz Landim-Alvarenga, Sony Dimas Bicudo	171
CARACTERÍSTICAS DA FORRAGEM QUE IMPLICAM NO COMPORTAMENTO E CONSUMO DE RUMINANTES / ACCUMULATION OF FORAGE AND ITS PERFORMANCE IN ANIMAL PRODUCTIVITY / ACCUMULATION OF FORAGE AND ITS PERFORMANCE IN ANIMAL PRODUCTIVITY. Luiz Carlos Vieira Junior, Luciano da Silva Cabral, Marco Aurélio Factori, Felipe Azevedo Ribeiro, Mário de Beni Arrigoni, Ciniro Costa.....	183
HEPATOZOONOSE CANINA NO BRASIL: ASPECTOS DA BIOLOGIA E TRANSMISSÃO / CANINE HEPATOZOONOSIS IN BRAZIL: ASPECTS OF THE BIOLOGY AND TRANSMISSION / HEPATOZOONOSIS CANINA EN BRASIL: ASPECTOS DE LA BIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN. Larissa de Castro Demoner, João Marcelo Azevedo de Paula Antunes, Lucia Helena O'Dwyer	193
LEISHMANIOSE FELINA: REVISÃO DE LITERATURA / LEISHMANIASIS IN CATS: REVIEW / LEISHMANIOSIS FELINA: REVISIÓN DE LA LITERATURA. Gabriela Villa Pirajá, Denise Theodoro da Silva, Luciana Cristina Baldini Peruca, Maria Fernanda Alves, Mirian dos Santos Paixão, Simone Baldini Lucheis, Wesley, José dos Santos, Livia Maísa Guiraldi	203
A GENÔMICA BOVINA - ORIGEM E EVOLUÇÃO DE TAURINOS E ZEBUINOS / THE BOVINE GENOMIC - ORIGIN AND EVOLUTION OF TAURINE AND ZEBUINE CATTLE / LA GENOMICA BOVINA - ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE TAURINOS Y CEBUINOS. Wilham Jorge.....	217
ALTERAÇÕES SENIS DO ENCÉFALO DE CANINOS – ASPECTOS IMAGINOLÓGICOS / AGING CHANGES OF CANINE BRAIN – IMAGING ASPECTS / ALTERACIONES SENILES EN EL CEREBRO DE LOS PERROS - ASPECTOS DE IMAGENOLÓGICOS. Viviam Rocco Babicsak, Luiz Carlos Vulcano.....	238
RELATOS DE CASO/ CASE REPORTS/ ESTUDIOS DE CASO	
CONTRIBUIÇÃO DO MÉTODO ULTRASSONOGRÁFICO NO DIAGNÓSTICO DE PIONEFROSE EM UM CANINO / CONTRIBUTION OF THE ULTRASONOGRAPHIC METHOD IN THE DIAGNOSTIC OF PYONEPHROSIS IN A CANINE / CONTRIBUCIÓN DEL MÉTODO ECOGRÁFICO EN EL DIAGNÓSTICO DE PIONEFROSIS EN UN CANINO. Viviam Rocco Babicsak, Débora Rodrigues dos Santos, Karen Maciel Zardo, Alexandra Frey Belotta, Hugo Salvador Oliveira, Maria Jaqueline Mamprim, Luiz Carlos Vulcano, Vivian Lima De Souza, Leonardo Delatorre Kairalla, Cláudia Valéria Seullner Brandão	250
SURTO DE MANNHEIMIOSE PNEUMÔNICA EM OVINOS NO SUL DO BRASIL / OUTBREAK OF OVINE RESPIRATORY MANNHEIMIOSIS IN SOUTHERN BRAZIL /	

- BROTE DE MANNHEIMIOSIS NEUMÓNICAS EN OVINOS EN EL SUR DE BRASIL.** Luana D'Avila Farias, Fernando Lopes Leivas Leite, Silvana Beutinger Marchioro, Bernardo Garziera Gasperin, Felipe Libardoni, Eduardo Kenji Masuda, Glaucia Denise Kommers, Luiz Francisco Irigoyen, Agueda Castagna de Vargas.....255
- GOTA ÚRICA VISCERAL EM TUCANO TOCO (*Ramphastos toco*) / VISCERAL GOUT URIC IN TOUCAN TOCO (*Ramphastos toco*) / GOTA ÚRICA VISCERAL EN TUCÁN (*Ramphastos toco*).** Milena Pereira Coppola, João Carlos Zamae Rodrigues, Ana Angelita Sampaio Baptista, Júlio Lopes Sequeira, Raphael Lúcio Andreatti Filho, Adriano Sakai Okamoto.....260
- Geotrichum candidum* E SUA IMPORTÂNCIA NAS MASTITES / *Geotrichum candidum* AND THEIR IMPORTANCE IN MASTITIS / *Geotrichum candidum* Y SU IMPORTANCIA EN LA MASTITIS.** Helio Langoni, Felipe Freitas Guimarães, Guido Gomes Wanderley, Anelise Salina, Ubirajara Leony de Lavor264
- SÍNDROME VESTIBULAR PERIFÉRICA CONGÊNITA ASSOCIADA A MICROTIA EM CÃO / CONGENITAL PERIPHERAL VESTIBULAR SYNDROME ASSOCIATED WITH MICROTIA IN A DOG / SÍNDROME VESTIBULAR CONGÉNITA PERIFÉRICA RELACIONADA CON MICROTÍA EN EL PERRO.** Mariana Isa Poci Palumbo, Jorge Piovesan Conti, Maria Lúcia Gomes Lourenço, Luiz Henrique de Araújo Machado.....270
- ARTIGOS/ARTICLES/ARTÍCULOS
- USO DO ÁCIDO MEFENÂMICO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES EQUINOS / USE OF MEFENAMIC ACID IN EQUINE EMBRYOS RECIPIENTS / USO DEL ÁCIDO MEFENÁMICO EN RECEPTORAS DE EMBRIONES EQUINOS.** Tatiana Cabrera, José Antônio Dell'Aqua Junior.....275
- RESISTÊNCIA DE *Lactobacillus* sp. ISOLADOS DE SALAMES ARTESANAIS PRODUZIDOS NA REGIÃO SUL DO BRASIL A ANTIBIÓTICOS / ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Lactobacillus* sp. ISOLATED FROM NATURALLY FERMENTED SALAMI PRODUCED IN SOUTHERN BRAZIL / RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE LACTOBACILLUS SP. AISLADOS DE SALAME ARTESANAL PRODUCIDO EN LA REGIÓN SUR DE BRASIL.** Tais H. Justo, Loyse Tussolini, Renata Ernlund Freitas de Macedo, Hanna Lethycia Wolupeck, Herta Stutz Dalla Santa, Osmar Roberto Dalla Santa.....285
- EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF DOG BITES CONSIDERING BITER DOGS AND VICTIMS / ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS AGRESSÕES POR CÃES SOB O PONTO DE VISTA DO CÃO AGRESSOR E DAS VÍTIMAS / DESCRIPCIÓN DE LAS MORDEDURAS POR PERROS DESDE EL PUNTO DE VISTA DEL PERRO AGRESOR Y DE LAS VÍCTIMAS.** Luzia Helena Queiroz, Daniel Sartore Buso, José Erisvaldo Silva296
- IMPLICAÇÕES DO USO DO EXTRATO DE LBD (LIPOPROTEINAS DE BAIXA DENSIDADE) OU DA GEMA DE OVO "PURIFICADA", SOBRE A MOTILIDADE E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA NO SÊMEN OVINO REFRIGERADO POR 24 OU 48 HORAS / IMPLICATIONS OF THE USE OF EXTRACT LDL (LOW DENSITY LIPOPROTEIN) OR THE EGG YOLK "PURIFIED" ON MOTILITY AND MORPHOLOGY IN OVINE SEMEN COOLED TO 24 OR 48 HOURS / IMPLICACIONES DEL USO DE EXTRACTO LBD (LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD) O DE YEMA DE HUEVO "PURIFICADA" EN LA MOTILIDAD Y MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA DEL SEMEN OVINO REFRIGERADO DURANTE 24 O 48 HORAS.** Marcel Barbosa Falleiros, Sony Dimas Bicudo, Leandro Rodello, Claudia Dias Monteiro, Sabrina Missae Sakashita, Romildo Romualdo Weiss.....307
- CONDENAÇÕES POR ASPECTO REPUGNANTE EM FRANGOS ABATIDOS SOB INSPEÇÃO ESTADUAL, NO MUNICÍPIO DE SÃO GONÇALO DOS CAMPOS – BAHIA, BRASIL / CONDEMNATIONS FOR VILE ASPECT IN SLAUGHTERED CHICKENS ANSWERABLE TO STATE INSPECTION LOCATED IN THE TOWNSHIP OF SÃO GONÇALO DOS CAMPOS – BA / CONDENACIONES POR ASPECTO REPUGNANTE DE POLLOS SACRIFICADOS BAJO CONTROL DE LA INSPECCIÓN ESTATAL EN EL MUNICIPIO DE SÃO GONÇALO DOS**

CAMPOS-BAHIA, BRASIL. Victor Toshio Ito Shiraishi, Pedro Alexandre Gomes Leite, Karoline Ribeiro Nascimento.....318

ANALGESIA PERIDURAL COM ROPIVACAÍNA ASSOCIADA AO MIDAZOLAM EM CADELAS SUBMETIDAS À OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA / EPIDURAL ANALGESIA WITH ROPIVACAINE ASSOCIATED TO MIDAZOLAM IN OVARIOSALPINGOHISTERCTOMY BITCHES / ANALGESIA EPIDURAL CON ROPIVACAÍNA ASOCIADA A MIDAZOLAN EN PERRAS SOMETIDAS A OVARIOSALPINGOHISTERECTOMÍA. Giancarlo Tortoza Bignelli e Canôa, Verônica Batista de Albuquerque, Guillermo Carlos Veiga de Oliveira, Joana Zafalon Ferreira, Juliana Pelloi Vides, Alexandre Alves Silveira Souza, Paulo Sergio Patto dos Santos, Renata Navarro Cassu, Valéria Nobre Leal de Souza Oliva.....326

EDITORIAL

CIÊNCIA E TECNOLOGIA: A CRIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO HUMANAS POR MEIO DE CLONAGEM

Já é possível a produção de clones a partir da transferência do núcleo de uma célula adulta em um óvulo, cujo DNA fora removido. A mesma técnica foi utilizada na clonagem que deu origem a ovelha Dolly no de ano de 1996, que foi o primeiro mamífero clonado por transferência nuclear. Este fato está sendo considerado o maior avanço obtido desde a produção da Dolly.

Sabe-se que as células tronco embrionárias poderá auxiliar no tratamento de várias doenças, pois tem condições de se tornar células de qualquer parte do organismo, com menor risco de rejeição. Desta forma há expectativa positiva para a cura de doenças como diabetes e Parkinson. São várias as tentativas da criação de células humanas desta forma, até então, não obtida. Em 2005 o Sul coreano Woo Suk Hwang anunciou os seus resultados, entretanto, foram desmentidos, sendo considerado um dos maiores casos de fraude científica na história recente.

O método utilizado surpreendeu a comunidade científica. Inicialmente obteve-se resultado positivo com óvulos de macacos e de acordo com as leis americanas postergou-se a realização de testes em humanos. A destruição de embriões é polêmica e há questionamentos éticos e há o receio de que esta tecnologia já possa ser usada para a criação de clones humanos. São os avanços da ciência e da tecnologia que podem ser interessantes para a utilização em benefício tanto de humanos como dos animais, mas que por outro lado, gera discussão pelos aspectos negativos, e que dependem do ser humano. Há que se contrapor os aspectos positivos e negativos da alta tecnologia, e ao que tudo indica a sua utilização é o caminho para a resolução de muitos problemas de saúde e o aperfeiçoamento na sua obtenção e utilização é a grande expectativa da humanidade.

Este número da Revista traz os seguintes artigos de revisão: Complexo gengivite estomatite felina: revisão de literatura; Aspectos ultraestruturais dos complexos cumulus-oócito de mamíferos; Características da forragem que implicam no comportamento e consumo de ruminantes; Hepatozoonose canina no Brasil: Aspectos da biologia e transmissão; Leishmaniose felina: Revisão de literatura; A genômica bovina - origem e evolução de taurinos e zebuinos; Alterações senis do encéfalo de caninos – aspectos imaginológicos. Os relatos de caso: Contribuição do método ultrassonográfico no diagnóstico de piodermite em um canino ; Surto de manheimiose pneumônica em ovinos no sul do Brasil; Gota úrica visceral em tucano toco (*Ramphastos toco*); *Geotrichum candidum* e sua importância nas mastites; Síndrome vestibular periférica congênita associada a microtia em cão. Artigos: Uso do ácido mefenâmico em receptoras de embriões equinos; Resistência de *Lactobacillus sp.* isolados de salames artesanais produzidos na região sul do Brasil a antibióticos; Epidemiological aspects of dog bites considering biter dogs and victims; Implicações do uso do extrato de LBD (lipoproteínas de baixa densidade) ou da gema de ovo “purificada”, sobre a motilidade e morfologia espermática no sêmen ovino refrigerado por 24 ou 48 horas; Condenações por aspecto repugnante em frangos abatidos sob inspeção estadual, no município de São Gonçalo dos Campos – Bahia, Brasil; Analgesia peridural com ropivacaína associada ao midazolam em cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia.

Prof. Helio Langoni
Editor-Chefe

COMPLEXO GENGIVITE ESTOMATITE FELINA: REVISÃO DE LITERATURA

Kelly Sanches Matilde¹
Maria Lúcia Gomes Lourenço²
Fabiola Soares Zahn³
Luiz Henrique de Araújo Machado⁴

RESUMO

O Complexo Gingivite Estomatite Felina (CGEF) é uma doença inflamatória grave da cavidade oral de etiologia desconhecida, sendo uma das doenças mais dolorosas e frustrantes da medicina felina. Com evolução crônica e de difícil tratamento, a doença se caracteriza por lesões hiperêmicas, proliferativas e ulcerativas localizadas preferencialmente na região dos arcos glossopalatinos (*fauces*), estendendo-se em diversas porções da cavidade oral. O principal achado histopatológico do CGEF é o infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos e plasmócitos. A doença pode ser controlada pelo tratamento periodontal associado ao controle da placa bacteriana, extrações dentárias, antibioticoterapia e/ou imunossupressão. A resposta ao tratamento é variável sendo a evolução incompleta, transitória e imprevisível.

Palavras-chave: gatos, úlceras, cavidade oral

FELINE GINGIVITIS-STOMATITIS COMPLEX: A REVIEW**ABSTRACT**

Feline gingivitis-stomatitis complex is a severe inflammatory oral disease of unknown etiology and is considered one of the most painful and frustrating diseases in feline medicine. The syndrome is chronic and difficult to treat and is characterized by hyperemic, proliferative and ulcerative lesions preferentially located at fauces and extending to different portions of the oral cavity. The main histopathological finding is the inflammatory infiltrate with predominant lymphocytes and plasmocytes. The disease may be controlled by periodontal treatment associated to control of bacterial plaque, teeth extractions, antibiotic therapy and/or immunosuppression. The response to treatment is variable with incomplete remission and transitory and unpredictable evolution.

Keywords: cats, ulcers, oral cavity

COMPLEJO GINGIVITIS-ESTOMATITES FELINA: REVISIÓN DE LA LITERATURA**RESUMEN**

El complejo gingivitis-estomatitis felina (CGEF) es una enfermedad inflamatoria grave de la cavidad oral, de etiología desconocida y uno de los padecimientos más dolorosos y frustrantes dentro de la medicina felina. De evolución crónica y de difícil tratamiento, la enfermedad se caracteriza por lesiones hiperémicas, proliferativas y ulcerativas localizadas usualmente en la

¹ Residente do Depto. de Clínica Veterinária – FMVZ-UNESP-Botucatu, Distrito de Rubião Jr. S/N. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, Tel: (14) 38116336, E-mail: ksm_vet@hotmail.com

² Prof. Ass. Dr. do Depto. de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu, Distrito de Rubião Jr. S/N. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, (14) 38802044, mege@uol.com.br.

³ Prof. Substituta do Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu, Distrito de Rubião Jr. S/N. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, (14) 38802237, fabiola@fmvz.unesp.br

⁴ Prof. Ass. Dr. do Depto. de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu, Distrito de Rubião Jr. S/N. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, (14) 38802043, henrique@fmvz.unesp.br

región de los arcos glosopalatinos (fauces), que se extienden hacia diversas regiones de la cavidad oral. El principal hallazgo histopatológico de CGEF es el infiltrado inflamatorio con predominio de linfocitos y plasmocitos. La enfermedad puede ser controlada a través de tratamiento periodontal asociado al control de la placa bacteriana, extracciones dentarias, antibiotioterapia y/o inmunosupresión. La respuesta al tratamiento es variable, de evolución incompleta, transitoria e imprevisible.

Palabras clave: gatos, úlceras, cavidad oral

INTRODUÇÃO

Na medicina felina as afecções inflamatórias da cavidade oral são freqüentes, sendo a gengivite-estomatite (GE) considerada a segunda causa mais freqüente de enfermidade oral em gatos, superada apenas pela doença periodontal (1). A GE tem-se mostrado cada vez mais freqüente na rotina da clínica médica de felinos (2).

O Complexo Gengivite-Estomatite Felina (CGEF) é uma inflamação oral crônica também conhecida por Estomatite Linfoplasmocítica, Gengivite-Estomatite Linfocítica-Plasmocítica, Estomatite Ulcerativa Crônica, Gengivite Crônica, Estomatite Plasmocítica, Gengivite-Faringite Plasmocitária, Estomatite Necrosante, Gengivoestomatite Crônica, Estomatite Felina Intratável, dependendo da distribuição das lesões e de acordo com o aspecto histopatológico. É uma doença comum caracterizada por inflamação intensa da gengiva e mucosa oral. (3-8). O uso do termo gengivite-estomatite é recomendado quando se descreve uma inflamação geral na gengiva e na cavidade oral (9, 10).

A inflamação severa e crônica da gengiva, mucosa alveolar e região glosso-palatina, representa uma reação exacerbada do organismo frente ao acúmulo de placa bacteriana e de cálculos dentários da doença periodontal (11). Desconhece-se a causa dessa síndrome, mas sugere-se a ocorrência de uma estimulação antigênica crônica (11). O cálculo dentário, muitas vezes presente na cavidade oral de gatos com gengivite-estomatite, tem seu envolvimento referido na patogenia desta enfermidade (9). Suspeita-se que gatos portadores desta doença desenvolvam uma resposta imunológica exacerbada a fatores desconhecidos, bactérias ou vírus presentes na cavidade oral (2).

De acordo com Lyon (9), não há predisposição racial, sexual ou etária, contudo, segundo Gaskel e Gruffyd (4), em certas raças como siamês, abissínio, persa, himalaio e birmanes, que apresentam uma forma mais grave da afecção, sugere-se uma possível tendência genética.

Alterações no sistema imunológico do paciente podem modificar sua resposta permitindo que infecções oportunistas contribuam para a cronicidade do processo (9). O diagnóstico e o tratamento representam um desafio para o clínico veterinário (11-13).

ETIOPATOGENIA

As lesões inflamatórias crônicas que afetam a gengiva e a mucosa oral dos felinos domésticos iniciam-se, em geral, como gengivite e progridem para outras regiões da cavidade oral, podendo estender-se das margens gengivais para outras áreas, atingindo a região do arco glossopalatino. Concomitante à estomatite, a doença periodontal e lesões de reabsorção dentária dos felinos (LRDF) podem estar presentes, contribuindo para a gravidade das lesões (12).

A gengivite-estomatite crônica felina (GECF) é uma síndrome caracterizada por resposta inflamatória focal ou difusa, cuja etiologia é muitas vezes desconhecida, porém aspectos multifatoriais tem sido incriminados, como vírus, bactérias, reação auto-imune, genética, nutrição, ambiente e a domesticação em geral (9).

O fator desencadeante e o processo fisiopatológico básico ainda não foram descobertos e podem diferir em cada caso. A intensa proliferação bacteriana, composta inicialmente por micro-organismos aeróbios *gram* positivos, sem motilidade, e posteriormente por anaeróbios *gram* negativos, com motilidade, levam à produção de hialuronidases e enzimas lisossomais que, em associação ao grande fluxo de células inflamatórias, acabam por irritar os tecidos orais. Isto desencadeia uma reação inflamatória, caracterizada por edema, eritema e ulcerações, dando início à gengivite e predispondo à formação de cálculo dentário. O cálculo é composto por bactérias e outras substâncias orgânicas, incorporadas a uma matriz inorgânica composta principalmente por hidroxiapatita, cálcio e fósforo (provenientes da saliva), originando uma placa mineralizada (11, 14).

As bactérias desempenham um papel claro na patogenia da gengivite crônica, uma vez que os animais respondem a tratamentos com antimicrobianos. Entretanto, ainda não está definido se este papel é mesmo etiológico ou trata-se de uma infecção oportunista secundária a outro processo envolvido (11). A resposta imunológica do organismo frente à placa bacteriana acarreta tanto uma gengivite quanto uma estomatite. Além disso, diversos fatores supracitados podem estar associados a uma disfunção da resposta imunológica (11, 12, 14).

Na gengivite os anticorpos produzidos pelos plasmócitos contra as toxinas bacterianas ativam o sistema complemento, atraindo células fagocíticas que, por sua vez, lesam as membranas das células gengivais, resultando em aumento da permeabilidade vascular local e intensa retração gengival (5, 6, 8, 9).

O aumento no nível sérico de imunoglobulinas, incluindo a γ -globulina, confirma a resposta imunológica exacerbada (15). Estudos demonstraram que a resposta inflamatória é semelhante, independente da etiologia e que a infecção secundária por micro-organismos frequentemente conduz a um processo supurativo superficial, dificultando ainda mais a determinação da causa primária (12).

Segundo Harley, Gruffydd-Jones e Day (16), gatos com gengivite estomatite crônica têm maiores concentrações séricas de imunoglobulina IgG, IgM e IgA, maiores concentrações salivares de IgG e IgM, mas concentrações significativamente menores de IgA. A importância da IgA na cavidade oral está relacionada à capacidade de neutralização de patógenos e toxinas, inibindo a aderência e o crescimento de micro-organismos na mucosa oral ou dentes, contribuindo com o aumento do fator de defesa não-específico. Entretanto, não está claro se o comportamento das imunoglobulinas descrito acima pode ser considerado uma causa ou consequência da doença inflamatória oral. O conhecimento do mecanismo imunológico envolvido na GE é importante a fim de se avaliar as consequências da progressão da doença quando houver qualquer supressão deste sistema. Nas doenças crônicas de origem metabólica ou endócrina o sistema imunológico poderá estar suprimido, fazendo com que a progressão da gengivite para a doença periodontal ocorra rapidamente, afetando também os animais jovens (9, 17).

As doenças sistêmicas como as infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da leucemia felina (FeLV), herpesvírus (FHV) e calicivírus (FCV), doenças imunomediadas e outros fatores tais como a dieta do animal e conformação oral (má oclusão ou desalinhamento dentário) podem contribuir para o desenvolvimento do CGEF, embora não esteja estabelecida a relação com estas doenças nem se possa afirmar, até o presente momento, serem o fator desencadeante da estomatite crônica (11, 13).

O FCV é um patógeno comum do trato respiratório superior dos felinos e está relacionado com a doença oral aguda e crônica, principalmente quando há comprometimento clínico do arco glosso-palatino, embora a participação deste vírus no desenvolvimento da doença não esteja esclarecida (12). Pelo exame histológico da cavidade oral de animais infectados com o calicivírus, foi possível descobrir que este vírus se replica preferencialmente nas células do epitélio tonsilar superficial e mucosa da região adjacente, provavelmente como

consequência da função imune das tonsilas no organismo, agindo como uma “barreira” contra possíveis agentes infecciosos (9, 18).

Outro vírus investigado, o FHV, está associado à rinotraqueíte dos felinos podendo causar ceratite e conjuntivite, faringite, estomatite, dermatite facial, aborto e mortalidade neonatal (7, 19). Em estudo realizado por Hennes (20) a prevalência de gatos com estomatite caudal infectados pelo FCV e FHV, utilizando-se a tecnologia PCR, foi de 97% e 15%, respectivamente. Segundo este autor, a presença do FCV foi significativamente correlacionada com a estomatite caudal, enquanto que o FHV não apresentou correlação, tanto nos gatos infectados como nos não infectados pelo FCV (20).

Em outro estudo, 88% dos gatos com a doença foram positivos tanto para FCV quanto para FHV e nenhum dos animais atendidos foi negativo para ambos. A infecção concomitante foi mais comum em animais com gengivite estomatite crônica do que em animais que apresentaram somente doença periodontal. Entretanto, não foi comprovada nenhuma relação entre esses vírus e o fator desencadeante do processo inflamatório (12).

Os gatos podem desenvolver diversas doenças se infectados pelo FIV, um retrovírus pertencente à subfamília dos Lentivírus mundialmente disseminado na população felina. Dentre as consequências mais comuns da infecção pelo FIV está a inflamação gengival crônica. Cerca de 50 a 80% dos gatos infectados pelo FIV apresentam gengivite crônica podendo, ou não, desenvolver outros sinais da doença (12, 20).

Segundo Wolf (21), os vírus da leucemia (FeLV) e imunodeficiência felina (FIV) não são significativamente associados com a gengivite-estomatite linfoplasmocítica, podendo-se encontrar animais com gengivite crônica que sejam negativos para a infecção por FIV (6). O vírus da leucemia e da imunodeficiência felina causam imunossupressão, favorecendo o aparecimento de infecções oportunistas e aumentando a gravidade das lesões na cavidade oral dos animais com CGEF (2). Apesar das controvérsias sobre a correlação da doença com esses vírus, os testes diagnósticos para FIV e FeLV devem ser realizados em qualquer gato com estomatite ou periodontopatia não responsiva, ou em animais que apresentem alteração no desenvolvimento com lesão periodontal concomitante (6, 21, 22).

A patogenia do CGEF está intimamente relacionada a um componente imunomediado (23). A inflamação gengival é ocasionada pela resposta do hospedeiro à contínua exposição a um antígeno bacteriano e aos efeitos diretos produzidos pelas bactérias causadoras da placa dental. A inflamação periodontal resulta do desequilíbrio entre a formação da placa bacteriana e a resposta imunológica do hospedeiro. Esse desequilíbrio ocorre quando há alteração da microbiota da cavidade oral ou quando o nível de imunidade individual é afetado por fatores ambientais. A formação de placas bacterianas é, portanto, a causa mais frequente da doença periodontal crônica. Quando o mecanismo de defesa do hospedeiro é ativado, o objetivo é a localização e destruição do antígeno, entretanto, o tecido do próprio hospedeiro pode também ser destruído durante o processo inflamatório (9).

Na mucosa oral hígida, são encontradas predominantemente citocinas oriundas do linfócito T-helper 1, devido a uma menor resposta à invasão bacteriana da microbiota residente na cavidade oral saudável. Contudo, em gatos com CGEF, cortes histológicos e imunoistoquímica demonstraram a presença tanto de linfócitos T-helper 1 quanto 2 (23). Nenhum agente etiológico específico foi comprovado como desencadeador da resposta imune. Uma das hipóteses na etiopatogenia da doença é a de um defeito imunológico do hospedeiro, que promove uma resposta exacerbada e a autodestruição dos tecidos orais envolvidos no processo inflamatório (2). Muitos gatos com GE apresentam diminuição da inflamação e melhora sintomática quando submetidos a um tratamento imunossupressor, reforçando o caráter imunomediado da doença (2).

A identificação do papel das citocinas na patogenia da afecção propiciou grandes perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, incluindo a manipulação, expressão ou a atividade de citocinas específicas *in vivo* (16).

As desordens nutricionais também contribuem para doença oral (9). A alergia alimentar é ocasionalmente implicada na etiopatogenia do CGE, sendo nos seres humanos associada ao consumo de alguns aditivos alimentares ou a deficiências de certos micronutrientes. Já nos gatos, atribuiu-se a uma resposta antigênica a algumas proteínas da dieta (1).

Pesquisas recentes têm apontado a presença da *Bartonella* spp, como um fator associado ou causador do CGEF (21, 24). A *Bartonella henselae* provoca a estomatite linfoplasmocítica em felinos, e a sua identificação por um teste sorológico recém introduzido no mercado norte-americano (FeBart® Test, National Veterinay, Franklin Lakes, NJ, EUA) sugere que alguns pacientes com estomatite estejam infectados com este agente (6, 21, 25).

Existem evidências de que as raças asiáticas sejam mais comumente afetadas pelo CGEF, indicando uma provável predisposição genética. Em humanos, como nos felinos, existe um fator hereditário para o desenvolvimento de estomatite, conhecido por “estomatite aftosa recorrente” (EAR) (26). Independente da raça, a idade média do aparecimento das lesões é por volta dos oito anos, atingindo também animais entre três e 15 anos (11, 13).

Há quatro graus de classificação para a gengivite dos felinos, baseia-se na intensidade e nos tipos de lesões na cavidade oral. De acordo com Waters et al. (27), os graus podem ser divididos em: zero (0) ausência de gengivite; (I) gengivite leve, hiperemia gengival discreta; (II) gengivite moderada, hiperemia evidente, ausência de ulceração; (III) gengivite grave hiperemia evidente, hiperplasia e/ou ulceração; (IV) gengivite muito grave, hiperemia bastante evidente, hiperplasia e/ou ulceração gengival, tecidos gengivais friáveis.

SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos mais frequentes da gengivite-estomatite incluem inapetência, anorexia, disfagia, halitose, sialorréia com estrias de sangue, dor intensa, perda de peso, pelagem sem brilho e desidratação (1, 2, 6, 13). Os animais podem ser assintomáticos, sendo a detecção das lesões orais e evidências de linfadenopatia submandibular, encontradas somente durante o exame físico (22). Outras manifestações clínicas são dificuldade de preensão dos alimentos, mudança na preferência alimentar (ração seca para alimentos úmidos), e exteriorização da língua, provavelmente pelo crescimento tecidual na região das fauces (2, 22). As manifestações clínicas estão diretamente relacionadas com o processo de inflamação difusa úlcero-proliferativa da mucosa alveolar, jugal, lingual e/ou do arco glosso-palatino. A saliva, na maioria dos gatos com estomatite, apresenta-se espessada e em fios (1, 11, 28).

Com frequência, os gatos acometidos apresentam dor pronunciada e podem tornar-se relutantes e agressivos durante a abertura e exame da cavidade oral (6). No exame físico, pode-se observar gengivite, estomatite e possivelmente palatite, glossite, faringite, faucite bilateral, ulcerações linguais e palatinas, além de linfadenopatia mandibular. A inflamação oral é frequentemente extensa e os tecidos afetados encontram-se tipicamente ulcerados, proliferativos e hiperêmicos (1, 28, 29).

As alterações normalmente coexistem com reabsorção odontoclástica dos felinos (LROF), onde os animais acometidos apresentam lesões de reabsorção dental, clínica e radiograficamente, representadas por áreas de ausência de substância dental. A LROF é resultante da atividade odontoclástica, a qual é estimulada pelas citocinas liberadas normalmente em áreas gengivais inflamadas, as quais são induzidas pela presença de elementos que constituem a placa bacteriana (11, 13, 29). Outras causas de inflamação oral incluem gengivite urêmica, complexo granuloma eosinofílico, alergia alimentar, carcinomas de células escamosas, reação a corpos estranhos, e doenças auto-imunes, como o pênfigo vulgar e o lúpus eritematoso sistêmico (9).

DIAGNÓSTICO

Uma anamnese detalhada é fundamental para o diagnóstico definitivo e deve incluir informações sobre a idade, tipo de alimentação recebida, modo de vida do animal, evolução do processo, duração dos sintomas, medicação utilizada e tratamentos previamente realizados assim como os resultados obtidos. O exame físico da cavidade oral, na maioria das vezes, é suficiente para fechar o diagnóstico. Entretanto, biópsia e exame histopatológico das lesões inflamatórias devem ser realizados, além de exames laboratoriais de triagem como hemograma, perfis renal e hepático (7).

Freqüentemente, os exames histopatológicos exibem hiperplasia do epitélio oral com ulcerações profundas e, abaixo um infiltrado plasmolinfocítico, infiltração de macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares na submucosa e células inflamatórias presentes na mucosa (11, 20).

Os testes sorológicos (ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) ou moleculares (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) para FIV e FeLV, FCV e FHV são indicados, a fim de se obter o prognóstico da doença quanto a possíveis recidivas e o grau de severidade das lesões (9, 20).

O diagnóstico diferencial inclui: imunossupressão associada ao FeLV, apresentações atípicas do granuloma eosinofílico, diabetes melitus, doença periodontal secundária ao hipotireoidismo, pênfigo vulgar, hiperplasia gengival primária grave, neoplasias como carcinoma de células escamosas e outras doenças de caráter auto-imune (1, 2).

As neoplasias muitas vezes são acompanhadas de inflamação, mas não constituem, por si só, doença inflamatória, todavia, o carcinoma, o fibrossarcoma e o melanoma podem apresentar lesões do tipo proliferativas, ulcerativas ou úlcero-proliferativas, mimetizando as lesões causadas por agentes infecciosos ou vice-versa. Embora a localização da maioria das neoplasias orais seja unilateral, diferente do que acontece no caso de CGEF, a realização de biópsia e exame histopatológico deve fazer parte da rotina cirúrgica (7).

TRATAMENTO

O tratamento dessa afecção é complexo, sendo empregadas várias medidas terapêuticas (2). Não existe até o momento nenhum tratamento eficaz para CGEF. Vários protocolos terapêuticos são descritos na literatura, como abordagem médica, cirúrgica ou a combinação de ambas (1, 11). Uma das características da estomatite felina é que, mesmo tida como não responsiva ao tratamento e, em consequência, frustrante, a afecção permanece limitada à cavidade oral (exceto nos gatos FIV e FeLV positivos) (6).

O envolvimento e disposição do proprietário são imprescindíveis para o sucesso terapêutico, devendo-se informar ao mesmo sobre o caráter crônico desta afecção e das diversas medidas terapêuticas, esclarecendo-o da possibilidade de refratariedade ao tratamento (1).

Todos os gatos com doença periodontal devem ser frequentemente submetidos à profilaxia dentária incluindo extração dos dentes com retração gengival (13, 22, 30), mobilidade, bolsa periodontal e exposição de furca (13), pois a doença periodontal pode causar CGEF ou contribuir para sua ocorrência. O exame radiográfico intra-oral deve ser realizado sempre que possível, para diagnosticar áreas de reabsorção óssea alveolar, presença de fragmentos de raiz ou lesões de reabsorção dentária. Nestas condições, estes dentes deverão ser extraídos por contribuírem com a cronicidade da afecção, já que a doença periodontal promove uma maior inflamação devido ao processo infeccioso (1, 7, 9).

A antibioticoterapia deve sempre ser associada à extração dentária devido ao provável envolvimento bacteriano na etiologia da gengivite estomatite (6). Os antibióticos mais eficazes são a clindamicina, a associação de metronidazol com espiramicina, amoxicilina com

ácido clavulânico, a doxiciclina ou a enrofloxacina (1, 9). Estas medidas terapêuticas estão indicadas em casos moderados, mas os resultados, embora satisfatórios, são frequentemente transitórios. A associação de antibióticos como a enrofloxacina (5,0 mg/kg por via oral, a cada 12 horas) e metronidazol (15,0 mg/kg por via oral, a cada 12 horas) apresenta sinergismo e tem mostrado resultados positivos em longo prazo (9).

Nos casos de recorrência de infecção dentro de 30 dias após a suspensão do tratamento antimicrobiano, a pulsoterapia pode ser efetiva. A meta é a prevenção da colonização bacteriana, primeiro passo da infecção. O antimicrobiano de escolha é administrado em dosagem normal durante três a quatro dias, seguidos por uma a duas semanas de intervalo e novo tratamento na semana seguinte. É crucial que a infecção ativa não esteja presente e que não exista outro fator envolvido na recorrência da infecção, para evitar a resistência ao antibiótico e uma nova infecção. Cremes antimicrobianos orais contendo gluconato de clorexidina também são benéficos. A melhora clínica é relatada pela diminuição da resistência das bactérias orais e a possibilidade de união da raiz nervosa ao epitélio (9).

Em gatos com exodontia parcial é recomendável o tratamento diário tópico com clorexidina 0,12% a fim de prevenir a formação de uma nova placa bacteriana (31). Apesar da profilaxia realizada pela escovação diária ser importante para o sucesso da terapia, sabe-se que diferente dos cães com periodontite, é difícil sua implementação devido ao comportamento pouco cooperativo dos gatos, ainda mais exacerbado nos casos de estomatite (2). A abordagem cirúrgica consiste essencialmente na extração de todos os dentes molares e pré-molares, existindo o risco de perpetuação do processo inflamatório caso haja retenção de algum fragmento da raiz no osso alveolar (1).

Apesar da extração completa ser um tratamento inespecífico, tem demonstrado sucesso em 80% dos casos por cerca de dois anos (1). Avaliando-se a resposta à extração, cerca de 60% dos gatos tiveram completa remissão da doença clínica e 20% tiveram remissão suave não requerendo tratamento. Dos 20% restantes, 13% ainda necessitaram de tratamento medicamentoso e 7% não foram responsivos à cirurgia ou à administração de qualquer medicamento (9). Estes casos podem permanecer em estado controlável, assintomático, embora as lesões estejam clinicamente presentes (1, 2, 13, 29).

Os antiinflamatórios esteróides são benéficos em 70% a 80 % dos casos (22), mas sua utilização no tratamento do CGEF é controversa. Como diversos vírus podem estar envolvidos na etiologia, a administração favoreceria a progressão da infecção. Por outro lado, devido à presença de um componente imunomediado, a diminuição da resposta do hospedeiro diante do estímulo antigênico seria benéfica, portanto, a utilização de corticosteróide deve ser cautelosa (1). No tratamento com corticosteróide utiliza-se prednisolona por via oral ou esteróides de depósito (metil-prednisolona), por via subcutânea (6, 13, 22). Se houver algum sucesso inicial e depois recorrência, pode-se repetir o tratamento antiinflamatório (6). Frequentemente há necessidade de tratamento por período indefinido (22). Caso haja a necessidade de utilização contínua ou de esteróides de depósito após quatro a seis meses, deve-se considerar a necessidade de extração dentária em toda a boca, visto que o uso crônico de acetato de metil-prednisolona pode resultar em diabetes melitus (6).

O único tratamento consistentemente bem sucedido de estomatite é a extração extensa de todos os dentes pré-molares e molares, localizados na região circunscrita às lesões, ou de todos os dentes da cavidade oral, sendo que as lesões podem levar meses para desaparecer (6, 9). A grande vantagem da extração extensa é que não se exige tratamento médico adicional na maioria dos casos e não há, tampouco, necessidade de higiene oral diária. Os gatos domésticos convivem bem sem os dentes, sendo que alguns ainda preferem ingerir ração seca após a extração dentária total (6).

A forma recombinante do interferon-alfa humano foi inicialmente utilizada em seres humanos e tem sido usado com sucesso na medicina veterinária no tratamento de infecções virais como FIV, FeLV, Calicivírus, Herpervírus e Peritonite infecciosa felina, revelando-se

bastante promissora no tratamento do CGEF, não só devido a sua ação anti-viral, mas também imunomoduladora (1, 24). O medicamento não é um agente viricida, mas pode ser utilizado na estimulação do sistema imune do gato, resultando em melhora clínica e melhor qualidade de vida (32). O uso do interferon-alfa diariamente e por longo período vem demonstrando bons resultados (13), com relatos inéditos de melhora. A dose de 30 UI por via oral é utilizada diariamente (22) ou a cada semana alternada (32). O tratamento deve ser feito durante toda a vida do animal, com avaliações trimestrais ou semestrais (1, 33).

A crisoterapia (sais de ouro) é utilizada em medicina para tratamento de certos tipos de tumores. Estudos indicam que a eficácia da terapêutica com sais de ouro não é superior à utilização de corticosteróides, antibióticos e higiene oral. Administra-se aurotioglicose ou tiomalato sódico de ouro uma vez por semana durante 16 a 20 semanas, até que se observe uma resposta, então a dose é reduzida para intervalos de 14 dias durante dois meses e depois mensalmente durante oito meses (22). Esta terapia deve ser utilizada com cautela, pois existem alguns efeitos colaterais como insuficiência renal, trombocitopenia e pancitopenia. Assim, durante o tratamento em animais, deve-se realizar exames de rotina como hemograma completo e exames bioquímicos (22).

A ciclosporina é um fármaco imunossupressor que tem sido amplamente utilizado em gatos submetidos a transplante renal. Tem uma ação reversível sobre os linfócitos T imunocompetentes e fator de crescimento dos linfócitos. Os riscos de toxicidade aumentam com sua utilização prolongada e com o aumento dos níveis sanguíneos da ciclosporina (34). Os efeitos adversos verificados em gatos ocorrem sobretudo quando a administração diária ultrapassa 15mg/kg, e incluem o aparecimento de diarreia e outros sintomas gastrointestinais, alterações linfó e mieloproliferativas, infecções secundárias devidas à imunossupressão e ainda alterações hepática e renal (1).

Sugere-se a utilização local de ciclosporina sob a forma de pomada a 0,5%, aplicada na gengiva ou nos lábios, ou como comprimidos (3mg/kg duas vezes ao dia), por no máximo três meses, ou até a resolução das lesões (6). Em gatos a dose recomendada varia de 0,5-10 mg/kg a cada 12 horas, por via oral. O tratamento deve ser iniciado com uma dose de 0,5 a 2,5 mg/kg, duas vezes ao dia, de forma a se obter níveis séricos de 250 a 500 ng/mL, devendo ser monitorizados 48 horas após o início do tratamento e depois a intervalos regulares (1).

A azatioprina também pode ser utilizada e quando em associação com prednisona ou prednisolona, auxilia na redução da dosagem destas. Como é um potente fármaco supressor de medula óssea, a contagem eritrocitária deve ser periodicamente monitorada (9).

A pentoxifilina tem sido descrita no tratamento da gengivite estomatite em cães pela capacidade de redução dos efeitos endotóxicos negativos dos mediadores de citocinas. A irritação gastrointestinal é um efeito colateral frequente (9). Em felinos, a dosagem é de 100 mg por via oral, a cada 12 horas (21).

A alteração dietética associada a outros protocolos pode contribuir para a melhora do paciente. Dietas caseiras e comerciais que minimizem a formação de cálculos dentários e que sejam simultaneamente hipoalergênicas podem ser escolhidas. A suplementação da dieta com antioxidantes, como vitamina A, C, e E, e minerais como Zinco, apresenta um efeito benéfico sobre a integridade da mucosa oral e pode contribuir para uma evolução mais favorável da GEEF (1).

A termoablação a laser é outra opção para a citoredução da proliferação da mucosa oral, formando crostas no tecido (1, 9, 34). Porém, não existem resultados bem documentados para demonstrar que esta terapia é melhor do que a extração de tártaro e o tratamento médico (6). A remoção do tecido proliferativo com laser reduz antígenos teciduais e a área disponível para adesão e multiplicação bacteriana, podendo ajudar no controle da doença (2).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O atendimento a felinos no Brasil vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. Sendo assim, o médico veterinário deve estar atento às afecções mais frequentes que acometem essa espécie. Assim como outras doenças específicas dos felinos, o complexo gengivite-estomatite é uma doença extremamente complexa, sem etiologia definida, e sem tratamento eficaz e definitivo. Portanto, se torna uma enfermidade frustrante tanto para o clínico, quanto para o proprietário do animal. A determinação da causa e a cura do CGEF ainda são um desafio

O proprietário deve ser conscientizado do seu papel na prevenção e no tratamento do CGEF, das dificuldades do tratamento e da ocorrência de recidivas.

De modo geral, o tratamento que exibe melhor resultado é a exodontia, acompanhada de tratamento periodontal dos dentes remanescentes. Nos casos refratários, pode-se obter o controle dos sinais clínicos pelo uso de medicamentos imune-estimulantes ou supressores e a realização da exodontia radical. A identificação precoce da enfermidade ainda é a melhor forma de se estabelecer a melhora da qualidade de vida do paciente.

REFERÊNCIAS

1. Niza MMRE, Mestrinho LA, Vilela CL. Gengivo-estomatite crônica felina – um desafio clínico. *Rev Port Cienc Vet.* 2004;99:127-35.
2. Costa PRS, Conceição LG, Moraes MP, Tsiomis AC, Duarte TS, Prado RFS, et al. Gengivite/estomatite linfocítico-plasmocitária em gatos – relato de quatro casos. *Clin Vet.* 2007;12(66):28-34.
3. Prescott CW. Some oral lesions in the cat. *Aust Vet J.* 1971;2:41-5.
4. Gaskell RM, Gruffyd TJ. Intractable feline stomatitis. *Vet Annu.* 1997;17:195-7.
5. Johnessee JS, Hurvitz AI. Feline plasma cell gingivitis-stomatitis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1983;19:179-81.
6. Harvey CE. Cavidade oral. In: Chandler EA, Gaskell CJ, Askell RM. *Clínica e terapêutica em felinos.* São Paulo: Roca; 2006. cap.15, p.312-25.
7. Pedersen NC. Inflammatory oral cavity diseases of the cat. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1992;22:1323-45.
8. White SD, Rosychuk RA, Janik TA. Plasma cell stomatitis-pharyngitis in cats: 40 cases (1973-1991). *J Am Vet Med Assoc.* 1992;200:1377-80.
9. Lyon KF. Gingivostomatitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2005;35:891-911.
10. Moreira PRR, Terra AP. Gengivoestomatite faringite felina (relato de caso). *Nosso Clin.* 2007;10(55):20-30.
11. Henet P. Chronic gingivo-stomatitis in cats: long-term follow-up of 30 cases treated by dental extractions. *J Vet Dent.* 1997;14:15-21.

12. Lommer MJ, Verstraete FJM. Concurrent oral shedding of feline calicivirus and herpesvirus 1 in cats with chronic gingivostomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18:131-4.
13. Gioso MA. *Odontologia para o clínico de pequenos animais.* 2ª ed. São Paulo: Manole; 2007.
14. Gruffydd-Jones TJ. Gingivitis and stomatitis. In: August JR. *Consultations in feline internal medicine.* Philadelphia: WB Saunders; 1991. v.3, p.397-402.
15. Ueno H, Hohdatsu T, Muramatsu Y. Does coinfection of *Bartonella henselae* and FIV induce clinical disorders in cats? *Microbiol Immunol.* 1996;40:617-20.
16. Harley R, Gruffydd-Jones TJ, Day MJ. Salivary and serum immunoglobulin levels in cats with chronic gingivostomatitis. *Vet Rec.* 2003;152:125-9.
17. Steuernagel E. *Gengivite-estomatite em felinos domésticos [monografia].* Joinville: Centro de Ciências Veterinárias, Universidade Castelo Branco; 2007.
18. Sperotto M, Cavaletti F, Menez J, Doretto J, Manzan RM, Mattos JFA, et al. Ocorrência de gengivite estomatite associada a calicivírus em um gato. In: *Anais do 4º Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; 2004, São Paulo.* São Paulo: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais de São Paulo; 2004. p.65.
19. Healey KAE, Dawson S, Burrow R, Cripps P, Gaskell CJ, Hart CA, et al. Prevalence of feline chronic gingivo-stomatitis in first opinion veterinary practice. *J Feline Med Surg.* 2007;9:371-81.
20. Hennet P. Relationship between oral calicivirus and herpesvirus carriage and “palatoglossitis” lesions. In: *Proceedings of the 9º Annual Veterinary Dental Forum & World Veterinary Dental Congress; 2005, Orlando.* Orlando: Academy of Veterinary Dentistry, American Veterinary Dental College, American Veterinary Dental Society; 2005. p.503.
21. Wolf AM. Gingivitis, stomatitis, and other oral lesions [Internet]. In: *Latin American Veterinary Conference; 2007, Lima.* Lima, Peru; 2007 [acesso em 2009 Abr 04]. Disponível em: <http://www.ivis.org>
22. Crystal MA. Gengivite-estomatite-faringite. In: *Norsworthy GD, Crystal MA, Tilley LP. O paciente felino.* 2ª ed. Barueri: Manole; 2004. p.279-84.
23. Addie DD, Radford A, Yam PS, Taylor D.J. Cessation of feline calicivirus shedding coincident with resolution of chronic gingivostomatitis in a cat. *J Small Anim Pract.* 2003;44:172-6.
24. Peak RM. Managing mouths in cats [Internet]. In: *Proceedings of the North American Veterinary Conference; 2005, Orlando.* Orlando, Florida: NAVC; 2005. p.219-21 [cited 2009 Abr 04]. Available from: <http://www.ivis.org>
25. Quimby JM, Elston T, Hawley J, Brewer M, Miller A, Lappin MR. Evaluation of the association of *Bartonella* species, feline herpesvirus 1, feline calicivirus, feline leukemia

- virus and feline immunodeficiency virus with chronic feline gengivostomatitis. *J Feline Med Surg.* 2008;10:66-72.
26. Greenberg MS, Pinto A. Etiology and management of recurrent aphthous stomatitis. *Curr Infect Dis Rep.* 2003;5:194-8.
 27. Waters L, Hopper CD, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Chronic gingivitis in a colony of cats infected with feline immunodeficiency virus and feline calicivirus. *Vet Rec.* 1993;132:340-2.
 28. Hofmann-Appollo F. Complexo gengivite-estomatite-faringite dos felinos [monografia]. São Paulo: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, Universidade Anhembi-Morumbi; 2008.
 29. Girão VCC. Complexo gengivite-estomatite-faringite dos felinos. In: Anais do 1º Ciclo de Atualização em Ciências Veterinárias; 2000, Fortaleza. Fortaleza - CE: UECE; 2000. p.53-4.
 30. Veturini MAFA. Estudo retrospectivo de 3055 animais atendidos no ODONTOVET® (Centro Odontológico Veterinário) durante 44 meses [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo; 2006.
 31. Deforge DH. Images in veterinary dental practice. Ulcerative lymphoplasmacytic stomatitis syndrome. *J Am Vet Med Assoc.* 2004;224:207-8.
 32. Norsworthy GD. Infecções do trato respiratório superior. In: Norsworthy GD, Crystal MA, Tilley LP. O paciente felino. 2ª ed. Barueri: Manole; 2004. p.567-70.
 33. Wonderling R, Powell T, Baldwin S, Morales T, Snyder S, Keiser K, et al. Cloning expression, purification, and biological activity of five type I interferons. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;89:13-27.
 34. Vaden SL. Cyclosporine and tacrolimus. *Semin Vet Med Surg Small Anim.* 1997;12:161-6.

Recebido em: 18/11/10

Aceito em: 22/05/12

ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DOS COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS

Leticia Ferrari Crocomo¹
Wolff Camargo Marques Filho²
Midyan Daroz Guastali²
Fernanda Da Cruz Landim-Alvarenga²
Sony Dimas Bicudo²

RESUMO

Nos mamíferos domésticos, a competência oocitária para suportar os subseqüentes estádios de desenvolvimento, que envolve os processos de fertilização e embriogênese inicial, depende não apenas da correta segregação cromossômica que caracteriza a maturação nuclear, mas principalmente, das modificações morfológicas e funcionais ao longo da oogênese e maturação citoplasmática. Qualquer distúrbio no padrão de desenvolvimento e migração das organelas citoplasmáticas assim como no processo de transcrição gênica, síntese proteica e expansão das células do *cumulus* resultará em menor potencial de desenvolvimento oocitário. Deste modo, dada a relevância do tema, esta revisão visa elucidar os principais aspectos ultraestruturais dos complexos *cumulus*-oócitos de mamíferos com ênfase aos eventos biológicos que ocorrem ao longo da maturação oocitária.

Palavras-chave: oogênese, maturação citoplasmática, ultraestrutura, mamíferos.

UTRASTRUCTURAL ASPECTS OF THE *CUMULUS*-OOCTE COMPLEXES OF DOMESTIC MAMMALS

ABSTRACT

In domestic mammals, the oocyte competence to support the subsequent stages of development, which involves the processes of fertilization and early embryogenesis, depends not only on the correct chromosome segregation that characterizes the nuclear maturation, but mainly, the morphological and functional changes throughout oogenesis and cytoplasmic maturation. Any disturbance in the pattern of development and migration of cytoplasmic organelles as well as the process of gene transcription, protein synthesis and *cumulus* cells expansion will result in lower development potential. Thus, considering the topic relevance, this review aims to elucidate the main ultrastructural aspects of the *cumulus*-oocyte complexes of mammals with emphasis on the biological events that occur during oocyte maturation.

Keywords: oogenesis, cytoplasmic maturation, ultrastructure, mammals.

ASPECTOS ULTRAESTRUTURALES DE LOS COMPLEJOS *CUMULUS*-OVOCITOS DE LOS MAMÍFEROS DOMÉSTICOS

RESUMEN

En los mamíferos domésticos, la capacidad de los ovocitos para soportar las fases que involucran los procesos de fertilización y embriogénesis temprana, no depende únicamente de la correcta segregación de los cromosomas que caracteriza a la maduración nuclear, sino

¹ Médica Veterinária formada na FMVZ-UNESP-BOTUCATU

² FMVZ-UNESP-Botucatu

principalmente, de los cambios morfológicos y funcionales durante la ovogénesis y la maduración citoplasmática. Cualquier alteración en el patrón de desarrollo y migración de los organelos citoplasmáticos, así como en el proceso de transcripción génica, en la síntesis de proteínas y en la expansión de las células del cumulus se traduce en la disminución del potencial de desarrollo de los ovocitos. Así, dada la importancia del tema, esta revisión tiene por objetivo elucidar los principales aspectos ultraestructurales de los complejos cumulus-ovocitos de los mamíferos con énfasis en los eventos biológicos que ocurren durante la maduración de los ovocitos.

Palabras clave: ovogénesis, maduración, citoplasmática, ultraestructura, mamíferos.

INTRODUÇÃO

Ainda durante a vida intra-uterina, após sucessivas mitoses, os oócitos iniciam a meiose que é interrompida no estadio diplóteno da prófase I, morfológicamente identificado pela vesícula germinativa (VG). Neste estadio, os oócitos agora designados primordiais ou imaturos podem permanecer por vários anos sendo que, a partir da puberdade, serão recrutados para completar seu desenvolvimento (1).

Durante este período de bloqueio meiótico, apesar da aparente quiescência nuclear, os oócitos sofrem importantes mudanças moleculares e citoesqueléticas, caracterizadas pela intensa transcrição gênica, síntese proteica e desenvolvimento de organelas, aumentando expressivamente de volume (2). Concomitantemente, as células da granulosa se associam por interações moleculares, formando os folículos, considerados unidade funcional do ovário (3).

Ao longo do desenvolvimento folicular, embora os oócitos permaneçam em VG, as células da granulosa sofrem alterações, passando de planas à cubóides, e se proliferam, determinando a diferenciação dos folículos do estadio primordial até antral (4). Este último estadio se caracteriza pela formação do antro, uma cavidade preenchida por um fluido viscoso rico em esteróides, que promove a separação das células da granulosa, sendo que o grupo de células em íntimo contato com o oócito corresponde às células do *cumulus* (1).

Os folículos antrais são responsivos às gonadotrofinas e, na maioria dos mamíferos domésticos, a meiose oocitária é retomada sob estímulo primário do LH (5). Diferentemente, nas cadelas, os oócitos são ovulados ainda no estadio de VG e o reinício meiótico ocorre no oviduto (6). Esta segregação cromossômica que caracteriza a meiose corresponde à maturação nuclear e é essencial para formação de gametas haplóides (5).

Concomitantemente à maturação nuclear, a atividade transcricional cessa e o complexo *cumulus*-oócito (COC) sofre marcantes alterações morfológicas e funcionais que caracterizam a maturação citoplasmática e a expansão do *cumulus* e são essenciais para aquisição da competência oocitária (5). Deste modo, dada a relevância do tema, esta revisão visa abordar as principais modificações ultraestruturais nos oócitos de mamíferos ao longo da maturação com enfoque às características e distribuição das organelas citoplasmáticas e células do *cumulus*, ressaltando a importância destes eventos.

ULTRAESTRUTURA DO NÚCLEO

De acordo com critérios morfológicos, os oócitos podem ser classificados em diferentes estádios da meiose, conforme definido por Hyttel et al. (7) e Hewitt e England (8). Sendo assim, oócitos imaturos morfológicamente identificados pela vesícula germinativa, se caracterizam pela presença de núcleo esférico localizado na periferia do ooplasma com carioteca íntegra, cromatina pouco condensada e nucléolo visível (Figura 1A).

O reinício meiótico é marcado pela quebra da vesícula germinativa (QVG), caracterizada pela marcante condensação cromossômica e dissolução da membrana nuclear

descontínua, porém ainda com aspecto vesicular. Com a progressão da meiose, se observa o estadio de metáfase I (MI), no qual os cromossomos condensados se organizam na placa metafásica localizada perifericamente no ooplasma (7, 8) (Figura 1B).

É possível visualizar ainda os estádios de anáfase I, na qual os cromossomos homólogos estão se separando e há fuso visível, telófase I, no qual os cromossomos já estão separados e metáfase II (MII), caracterizado pela extrusão do primeiro corpúsculo polar, representado por um grupo denso de cromossomos no espaço perivitelinico (Figura 1C). Neste último estadio, os oócitos se mantêm até a fecundação quando a segunda divisão meiótica se completa (7, 8). Os demais estadios da meiose são dificilmente diferenciados por se tratarem de eventos intermediários de um processo dinâmico.

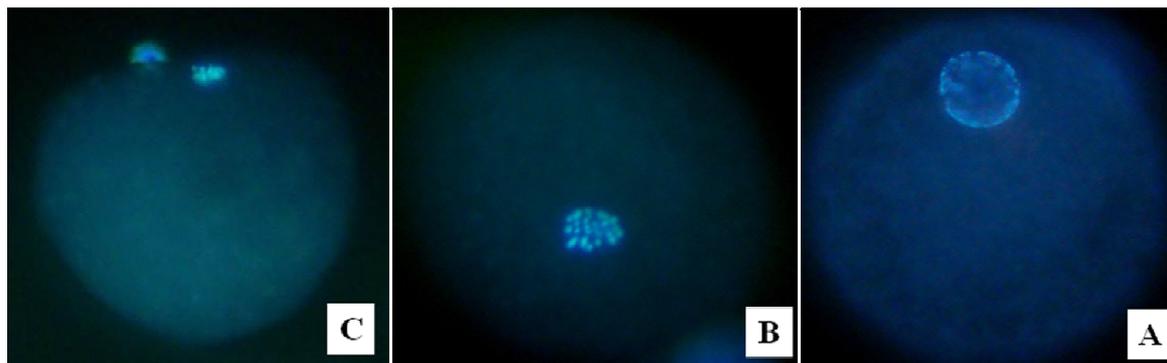


Figura 1. Estádios da meiose em oócitos corados e analisados em microscópio de fluorescência: (A) vesícula germinativa; (B) metáfase I; (C) metáfase II (Aumento 200X). Crocomo (9)

ZONA PELÚCIDA E ESPAÇO PERIVITELÍNICO

A zona pelúcida consiste num revestimento acelular, transparente e relativamente espesso que envolve os oócitos de mamíferos. Esta estrutura é formada durante a foliculogênese, especificamente no estadio de folículo primário, pela deposição das proteínas ziptina (ZP)1, ZP2 e ZP3, e permanece envolvendo o embrião ao longo de todo desenvolvimento pré-implantacional. Além de conferir proteção aos oócitos e embriões, a zona pelúcida contém receptores que permitem a adesão dos espermatozoides e também atua como barreira à poliespermia (10).

A formação da zona pelúcida define uma área ao redor do oócito denominada espaço perivitelinico cujo tamanho varia consideravelmente ao longo da oogênese. Nos oócitos em VG o espaço perivitelinico é pouco desenvolvido sendo dificilmente visualizado em microscópio óptico. Com a retomada e progressão da maturação oocitária, este espaço dilata e se torna assimétrico após a extrusão dos corpúsculos polares (11).

Evidências indicam que o espaço perivitelinico é preenchido por uma matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos secretados tanto pelo oócito quanto pelas células do *cumulus* quando sob estímulo gonadotrófico. Estes polissacarídeos, em especial o ácido hialurônico, têm potencial de reter grandes volumes de água e, devido a isso, são considerados os principais responsáveis pela dilatação do espaço perivitelinico ao longo da maturação oocitária (12). Tem sido proposto ainda que o ácido hialurônico consiste numa barreira à poliespermia, uma vez que dificulta a fusão do espermatozoide no oolema (11).

Além disso, dada a permeabilidade da zona pelúcida, a composição da matriz que preenche o espaço perivitelinico se altera conforme a localização do COC, apresentando características semelhantes ao fluido folicular quando no folículo antral ou composição proteica similar à secreção do oviduto quando no seu interior (13, 14).

Tem sido constatado ainda que o tamanho deste espaço interfere na fertilização do oócito de mamíferos. Em oócitos de suínos, camundongos e coelhos, foi relatada menor

incidência de poliespermia em oócitos com espaço perivitelínico mais dilatado e vice-versa (15, 16). Com a fertilização, este espaço se dilata em decorrência da extrusão do conteúdo dos grânulos corticais, também envolvidos no bloqueio à poliespermia (11).

COMPLEXOS DE GOLGI

O complexo de Golgi está envolvido com a síntese, armazenamento e processamento de moléculas internalizadas, proteínas e demais substâncias, sendo reconhecido principalmente pela formação dos grânulos corticais e secreção das proteínas que constituem a zona pelúcida (17). No entanto, embora desempenhe importantes funções, sua importância direta na maturação oocitária, fertilização e embriogênese inicial ainda é desconhecida (18).

Em contrapartida, a dinâmica das membranas do complexo de Golgi ao longo da maturação tem sido descrita em diferentes espécies animais, como camundongos, macacos e bovinos (17, 19). Nos oócitos imaturos, esta organela é observada como um sistema de cisternas achatadas e vesículas, bem desenvolvido e ativo que está disperso por todo o ooplasma, porém ligeiramente mais concentrado na região periférica do oócito (9).

Com a progressão da maturação, esta organela sofre fragmentação e assim permanece até o oócito atingir o estadió de MII. Durante a QVG, que marca a retomada da meiose oocitária, estes fragmentos se localizam principalmente na região perinuclear, tendendo à distribuição mais uniforme pelo ooplasma (19). Evidências indicam que a fragmentação de organelas como o complexo de Golgi durante a divisão celular garante que cada nova célula a ser originada receba quantidades similares de todo material celular (20).

GRÂNULOS CORTICAIS

Os grânulos corticais são organelas secretoras derivadas do complexo de Golgi, encontradas exclusivamente nos oócitos, e responsáveis pela reação cortical que impede a poliespermia. Seu conteúdo inclui uma grande diversidade de proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanos e sua distribuição no ooplasma consiste numa importante etapa da maturação citoplasmática sendo utilizada como critério de avaliação desta (21).

Sua formação ocorre no início do desenvolvimento folicular quando o complexo de Golgi se encontra funcionalmente ativo. No entanto, o exato momento de sua síntese varia entre espécies. Em ratos e camundongos, os grânulos corticais podem ser observados nos folículos primários enquanto que em macacos, hamsters, coelhos e humanos, eles começam a surgir nos folículos secundários (22).

A migração destas organelas pelo ooplasma ocorre de maneira coordenada com o reinício meiótico e progressão da maturação oocitária. Nos oócitos em VG, se encontram distribuídas em grumos por todo ooplasma e conforme ocorre a progressão da maturação nuclear, migram em direção à região cortical do oócito, sendo que, no estadió de MII se localizam próximo à superfície interna da membrana plasmática, formando uma monocamada estratégica para prevenir a poliespermia (23, 24). Este padrão de distribuição dos grânulos corticais tem sido descrito em diversas espécies animais como camundongos (25), bovinos (23), equinos (26), suínos (27) e ovinos (9).

Com a fecundação e conseqüente elevação da concentração intraoocitária de íons de cálcio (Ca^{+2}), ocorre a fusão dos grânulos corticais à membrana plasmática e exocitose dos seus conteúdos no espaço perivitelínico, caracterizando a reação cortical (26). A maior incidência de poliespermia nos oócitos maturados *in vitro* é decorrente da inadequada maturação citoplasmática caracterizada, principalmente, pela distribuição anormal dos grânulos corticais e conseqüente falha na reação cortical (28).

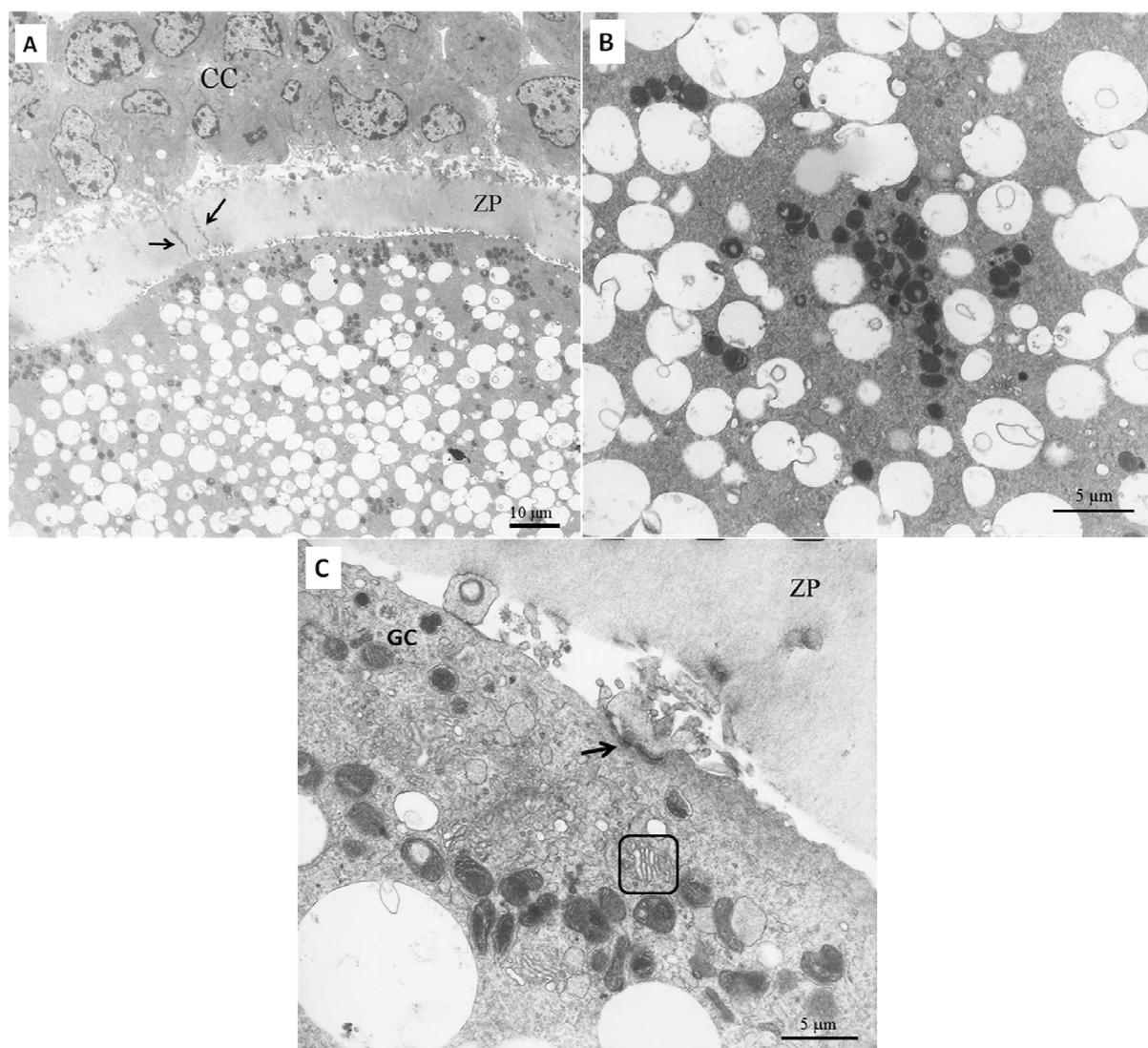


Figura 2. Ultraestrutura de COCs imaturos de ovino em microscopia eletrônica de transmissão. (A) *Cumulus* (cc) compacto com projeções citoplasmáticas (seta), espaço perivitelínico pouco desenvolvido, muitas gotículas de lipídio e vesículas, mitocôndrias preferencialmente na periferia; (B) Grupos de grânulos corticais e mitocôndrias dispersos no ooplasma; (C) Presença de complexos juncionais (seta), Complexo de Golgi bem desenvolvido (círculo), mitocôndrias pleomórficas na periferia, poucos grânulos corticais (GC) próximo à membrana plasmática. Crocomo (9).

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

O retículo endoplasmático é constituído por uma rede de túbulos achatados e interconectados que se invaginam da membrana plasmática e se comunicam com a carioteca, podendo estar associado ou não à ribossomos, o que lhe confere a característica de rugoso ou liso (29). Imagens de microscopia eletrônica de transmissão revelam que o retículo endoplasmático rugoso apresenta uma aparência tubular e granular enquanto que o retículo endoplasmático liso aparece como um sistema de túbulos dilatados e contorcidos (30).

Trata-se de uma organela multifuncional que está envolvida na síntese e degradação de membranas, proteínas e lipídios. No entanto, nos oócitos, esta organela se destaca, principalmente, pela sua capacidade de estoque e liberação de íons de cálcio (Ca^{+2}), sendo responsável pela regulação da concentração intracelular deste íon (29).

O aumento transitório da concentração intraocitária de Ca^{+2} em decorrência da penetração espermática, durante a fertilização, é essencial para que ocorra excitose dos

grânulos corticais, retomada e progressão da meiose nos oócitos em MII e recrutamento do mRNA materno necessário para ativação do genoma embrionário (31).

Evidências indicam que a proteína fosfolipase C zeta, considerada fator espermático ativador do oócito, promove a clivagem do fosfatidilinositol 1, 4,5 bifostato, um fosfolípido de membrana, resultando na formação de dois segundo mensageiros, o diacilglicerol e o inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). Este último, ao interagir com seu receptor específico no retículo endoplasmático, promove ativação dos canais de cálcio (32).

Esta capacidade de liberação de íons Ca⁺² é desenvolvida ao longo da maturação oocitária. Nos oócitos imaturos, o retículo endoplasmático é menos sensível ao IP₃ e se encontra uniformemente disperso por todo ooplasma. Com a progressão da maturação, ocorre incremento da quantidade e sensibilidade dos receptores para IP₃ além de reorganização ultraestrutural desta organela que tende a se acumular na periferia do ooplasma, sendo que, no estadio de MII se localiza imediatamente abaixo da membrana plasmática. Esta localização específica visa a rápida liberação de Ca⁺² no momento da fecundação (29, 33).

MITOCÔNDRIAS

O adequado desenvolvimento oocitário e embrionário depende da disponibilidade de adenosina trifosfato (ATP) suficiente para atender suas demandas metabólicas. Neste contexto, as mitocôndrias desempenham importante função uma vez que são responsáveis pelo fornecimento de toda energia requerida. Deste modo, a quantidade assim como o deslocamento destas organelas para áreas de maior consumo de energia são determinantes para os oócitos e blastocistos durante os períodos críticos do ciclo celular (34).

No estadio de VG, as mitocôndrias se localizam preferencialmente na região periférica do oócito visto o elevado requerimento energético decorrente da íntima associação com as células do *cumulus*. Com a progressão da maturação oocitária, estas organelas tendem à uma distribuição mais uniforme, sendo que, após a extrusão do primeiro corpúsculo polar, se dispersam por todo ooplasma (7). Este padrão de distribuição tem sido observado em diversas espécies animais como camundongos (35), bovinos (34), suínos (36) e ovinos (9) e qualquer alteração neste processo prejudica as subseqüentes fases de desenvolvimento (37).

Ao longo da maturação oocitária, a quantidade de mitocôndrias tende a aumentar para suprir a elevada demanda energética durante a formação do fuso meiótico, condensação cromossômica, extrusão do corpúsculo polar, redistribuição das organelas citoplasmáticas, formação dos pró-núcleos após a fertilização e clivagem embrionária (38).

Além disso, em algumas espécies animais como ovinos (9) e caprinos (39) tem sido relatada a ocorrência de pleomorfismo mitocondrial. Segundo Fair, Hyttel e Greve (40), o formato da mitocôndria reflete seu grau de maturidade sendo considerada imatura quando arredondada ou ovalada e matura quando alongada. Já as projeções mitocondriais em forma de arco, conferem maior superfície a estas organelas, estando relacionadas ao elevado metabolismo oocitário.

GOTÍCULAS DE LIPÍDIOS, GRÂNULOS DE GLICOGÊNIO DE VESÍCULAS

As gotículas de lipídios servem de substrato para produção de energia e síntese de membranas ao longo da maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário (41). Devido a isso, geralmente são encontradas em associação com mitocôndrias e retículo endoplasmático constituindo as unidades metabólicas que estão diretamente relacionadas ao elevado metabolismo oocitário e tendem a se acumular na periferia do oócito (42).

No entanto, o acúmulo excessivo de lipídio tanto no oócito quando no embrião é prejudicial, uma vez que potencializa a sensibilidade ao estresse oxidativo (43). Deste modo,

a quantidade, o tamanho e a distribuição destas inclusões citoplasmáticas interferem no potencial de desenvolvimento e na criotolerância dos oócitos e embriões (44).

Evidências indicam que o ácido graxo presente na circulação sanguínea, no fluido folicular e até mesmo nos diferentes meios de cultivo oocitário *in vitro* é captado pelas células somáticas, convertido em triacilglicerol e ésteres de colesterol, e estocado como gotículas de lipídio no citoplasma (44). Deste modo, alterações na dieta dos animais assim como os componentes dos meios de maturação *in vitro* como hormônios, fatores de crescimento e soro, podem afetar a quantidade e constituição deste tipo de inclusão citoplasmática nos oócitos, determinando sua qualidade e viabilidade (45).

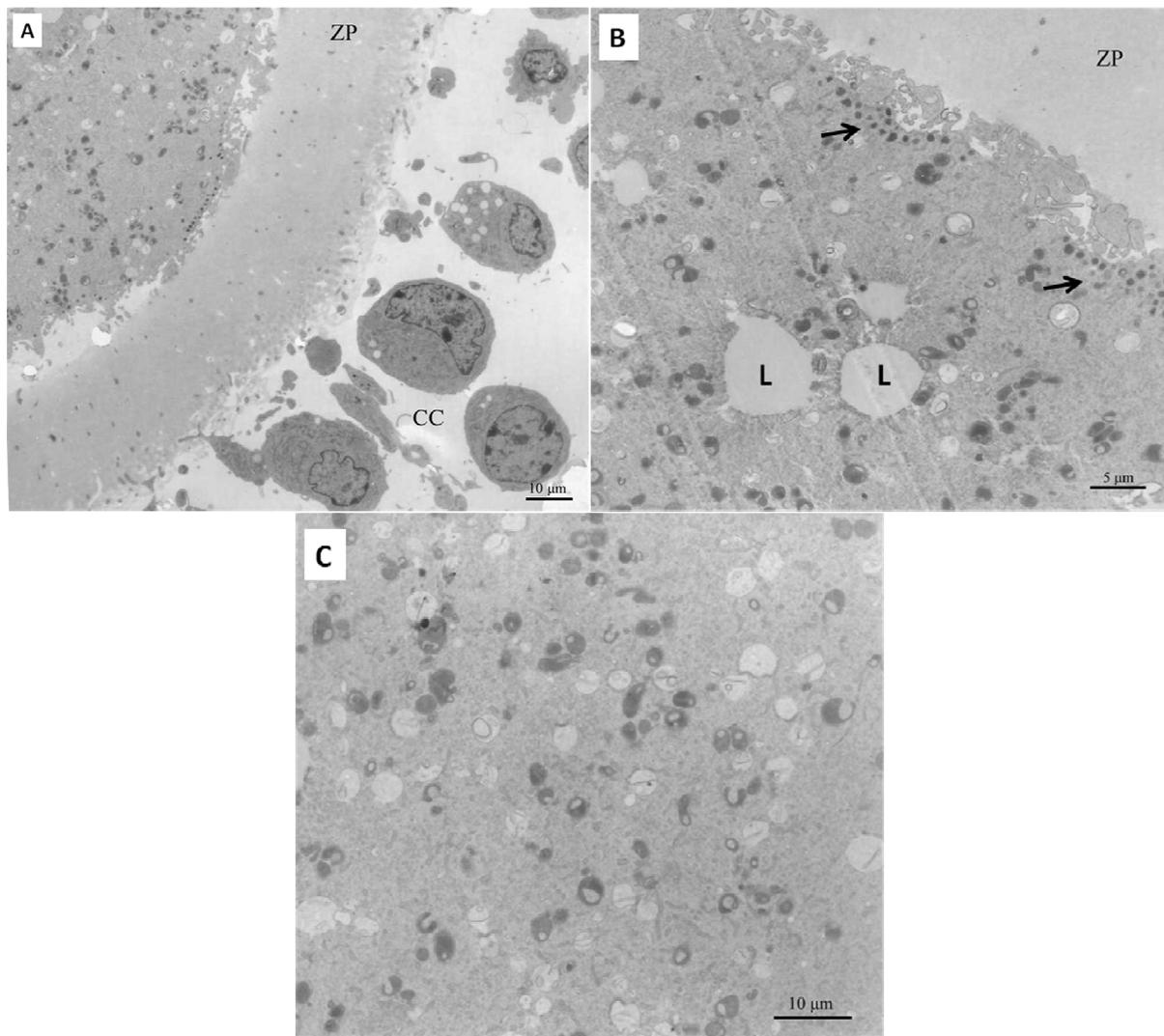


Figura 3. Aspectos ultraestruturais de COCs maduros de ovino em microscopia eletrônica de transmissão. (A) Expansão do *cumulus*, ausência das projeções citoplasmáticas atravessando a zona pelúcida (ZP), espaço perivitelínico dilatado; (B) Grânulos corticais alinhados à membrana plasmática (seta), gotículas de lipídio (L) maiores e em menor quantidade; mitocôndrias dispersas pelo ooplasma, algumas delas em associação com as gotículas de lipídio; (C) Aspecto do ooplasma: menor quantidade de vesículas e gotículas de lipídio, mitocôndrias pleomórficas espalhados pelo ooplasma. Crocomo (9).

A quantidade, tamanho e distribuição destas gotículas difere entre espécies e de acordo com o estágio de desenvolvimento oocitário. Em bovinos, Hytell et al. (7) relataram a presença de pequenas gotículas principalmente periferia de oócitos imaturos e tendência ao aumento de tamanho, formação de unidades metabólicas e localização mais centralizada em oócitos maduros. Já Niimura et al. (46) constataram redução do tamanho e quantidade destas inclusões citoplasmáticas ao longo da maturação oocitária.

Os grânulos de glicogênio consistem numa reserva de carboidrato e assim como as gotículas de lipídio servem como fonte de energia para o oócito (46). No entanto, até o momento se desconhece a origem e dinâmica desta inclusão citoplasmática ao longo da maturação oocitária. Nos oócitos de mamíferos, é possível observar ainda vesículas com diferentes tamanhos, formatos e conteúdos, contudo, a exata função destas estruturas ainda é desconhecida. Evidências sugerem que estão envolvidas com o estoque e transporte de metabólitos celulares e nutrientes, como o glicogênio (47).

RIBOSSOMOS

Todo RNA necessário para posterior síntese de proteínas indispensáveis aos processos de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário são transcritos ao longo da foliculogênese enquanto os oócitos estão mantidos no estadió diplóteno da prófase I. Com a retomada da meiose, o nucléolo se torna inativo e embora a atividade transcricional do oócito seja interrompida, sendo reestabelecida apenas com a ativação do genoma embrionário, a capacidade de tradução de mRNA pelos ribossomos e síntese proteica é mantida (48).

Deste modo, a síntese de ribossomos pela transcrição de genes RNA ribossômicos (rRNA) localizados no nucléolo e o acúmulo citoplasmático desta organela durante os estádios iniciais da foliculogênese é crucial para o desenvolvimento oocitário e embrionário (49). Evidências indicam ainda que os ribossomos tendem a se unir formando cadeias que assim são mantidas pela combinação com proteínas. Nesta forma, estas organelas são mantidas inativas no ooplasma, sendo recrutadas quando necessário para síntese proteica (48).

CÉLULAS DO *CUMULUS*

As células do *cumulus e corona radiata* correspondem ao grupo de células da granulosa que circundam o oócito e com o qual estabelecem íntima comunicação pela emissão de projeções citoplasmáticas que atravessam a zona pelúcida e dos complexos juncionais (50, 51).

A partir da transferência de substâncias de baixo peso molecular, as células do *cumulus* garantem a nutrição do oócito, contribuem para progressão da maturação citoplasmática e controlam o bloqueio e reinício meiótico (52). Além disso, modulam os efeitos dos hormônios e fatores de crescimento sobre o oócito, garantem sua conexão com o meio externo e auxiliam no processo de fertilização (51).

Os fatores solúveis sintetizados pelos oócitos também determinam importantes funções das células da granulosa como proliferação, esteroidogênese, secreção de inibina, expressão de receptores de LH, e a expansão das células do *cumulus*. No entanto, a natureza e função destes fatores não estão totalmente esclarecidas (53).

Quando imaturos, os oócitos se caracterizam pela presença de uma camada compacta de células do *cumulus* e integridade dos complexos juncionais, indispensáveis para o adequado desenvolvimento e aquisição de competência oocitária ao longo da foliculogênese (52). *In vivo*, sob estímulo gonadotrófico, as células do *cumulus* e da *corona radiata* sofrem expansão caracterizada pela síntese de uma matriz extracelular rica em ácido hialurônico que se deposita nos espaços intercelulares resultando na disjunção dos complexos juncionais e interrupção da comunicação bidirecional entre o oócito e as células do *cumulus*. Concomitante a este processo, ocorre a retomada da meiose oocitária devido à interrupção da transferência de moléculas moduladoras da maturação (54, 55).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial de desenvolvimento oocitário e embrionário está diretamente relacionado à adequada reorganização das organelas citoplasmáticas, à correta segregação cromossômica, e à manutenção da integridade e expansão das células do *cumulus* e corona radiata. Deste modo, a compreensão das alterações ultraestruturais ao longo da maturação oocitária serve de base para o desenvolvimento de novas pesquisas visando o esclarecimento dos eventos biológicos e aperfeiçoamento de biotecnologias reprodutivas que envolvem a maturação oocitária *in vitro*.

REFERÊNCIAS

1. Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM. Follicular development: mouse, sheep, and human models. In: Knobil and Neill's Physiology of reproduction. 3^a ed. San Diego: Academic Press; 2006. p.383-423.
2. Wessel GM, Brooks JM, Green E, Haley S, Voronina E, Wong J, et al. The biology of cortical granules. *Int Rev Cytol.* 2001;209:117-206.
3. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 1991;124:43-101.
4. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000;21:200-14.
5. Tosti E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:1-9.
6. Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, Viaris de Lesegno C, et al. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction.* 2005;130:193-201.
7. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology.* 1997;47:23-32.
8. Hewitt DA, England GCW. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J Reprod Fertil.* 1997;51:83-91.
9. Crocomo LF. Maturação *in vitro* de oócitos ovinos com o uso da roscovitina e ciclohexemida [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2011.
10. Bleil JD, Wassarman PM. Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980;77:1029-33.
11. Talbot P, Dandekar P. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microsc Res Tech.* 2003;61:349-57.
12. Ueno S, Niimura S. Comparison of the size of perivitelline space in mouse oocytes cultured with and without cumulus cells and possible hyaluronan production in oocytes. *Bull Facul Agric Niigata Univ.* 2009;61:127-33.

13. Collins A, Palmer E, Bezard J, Burke J, Duchamp G, Buckley T. A comparison of the biochemical composition of equine follicular fluid and serum at four different stages of the follicular cycle. *Equine Vet J.* 1997;25:12-6.
14. Buhi WC. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction.* 2002;123:355-62.
15. Ueno S, Niimura S. Size of perivitelline space and incidence of polyspermy in mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *J Mamm Ova Res.* 2008;25:44-9.
16. Yoshida N, Niimura S. Size of the perivitelline space and incidence of polyspermy in rabbit and hamster oocyte. *Reprod Med Biol.* 2011;10:31-41.
17. Glick BS, Malhotra V. The curious status of the Golgi apparatus. *Cell.* 1998;95:883-9.
18. Payne C, Schatten G. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. *Dev Biol.* 2003; 264:50-63.
19. Moreno RD, Schatten G, Ramalho-Santos J. Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte in vitro maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. *Biol Reprod.* 2002;66:1259-66.
20. Warren G, Wickner W. Organelle inheritance. *Cell.* 1996;84:395-400.
21. Damiani P, Fissore RA, Cibelli JB, Long CR, Balise JJ, Robl JM, et al. Evaluation of developmental competence, nuclear, and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol Reprod Dev.* 1996;45:521-34.
22. Liu M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:2-17.
23. Hosoe M, Shioya Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote.* 1997;5:371-6.
24. Wessel GM, Brooks JM, Green E, Haley S, Voronina E, Wong J, et al. The biology of cortical granules. *Int Rev Cytol.* 2001;209:117-206.
25. Ducibella T, Duffy P, Reindollar R, Su B. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging in vivo. *Biol Reprod.* 1990;43:870-6.
26. Carneiro GF, Liu IKM, Hyde D, Anderson GB, Lorenzo PL, Balli BA. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. *Mol Reprod Dev.* 2002;63:451-8.
27. Schoevers EJ, Bevers MM, Roelen BAJ, Colenbrander B. Nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes are not synchronized by specific meiotic inhibition with roscovitine during in vitro maturation. *Theriogenology.* 2005;63:1111-30.

28. Ducibella T, Dubey A, Gross V, Emmi A, Penzias AS, Layman L, et al. A zona biochemical change and spontaneous cortical granule loss in eggs that fail to fertilize in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*. 1995;64:1154-61.
29. Kline D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. *Curr Top Dev Biol*. 2000;50:125-54.
30. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*. 2002;3:944-50.
31. Mehlmann LM, Kline D. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: Calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biol Reprod*. 1994;51:1088-98.
32. Mehlmann LM, Mikoshiba K, Kline D. Redistribution and increase in cortical inositol 1,4,5-trisphosphate receptors after meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol*. 1996;180:489-98.
33. Stricker SA. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. *Semin Cell Dev Biol*. 2006;17:303-13.
34. Tarazona AM, Rodrigues JI, Restrepo LF, Olivera-Angel M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. *Reprod Domest Anim*. 2006;41:5-11.
35. Tokura T, Noda Y, Goto Y, Mori T. Sequential observation of mitochondrial distribution in mouse oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet*. 1993;10:417-26.
36. Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT, et al. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. *Reproduction*. 2001;122:155-63.
37. Suzuki H, Satoh M, Toyokawa K. Changes in distribution of active mitochondria during oocyte maturation and fertilization in the hamster. *J Mamm Ova Res*. 2005;22:163-9.
38. Cummins J. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;115:S23-9.
39. Lucci CM, Silva RV, Carvalho CA, Figueiredo R, Bão N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Rumin Res*. 2001;41:61-9.
40. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*. 1995;42:437-42.
41. Jeong WJ, Cho SJ, Lee HS, Deb GK, Lee YS, Kwon TH, et al. Effect of cytoplasmic lipid content on *in vitro* developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology*. 2009;72:584-9.
42. Ambruosi B, Lacalandra GM, Iorga AI, De Santis T, Mugnier S, Matarrese R, et al. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications

- on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology*. 2009;71:1093-104.
43. Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev*. 2002;61:57-66.
 44. Sturmey RG, O'Toole PJ, Leese HJ. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction*. 2006;132:829-37.
 45. Fouladi-Nashta AA, Gutierrez CG, Gong JG, Garnsworthy PC, Webb R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. *Biol Reprod*. 2007;77:9-17.
 46. Niimura S, Takano H, Onishi A, Hosoe M. Changes in the amount of proteins, glycogen and lipids in porcine oocytes during in vitro meiotic maturation. *Anim Sci J*. 2002;73:327-32.
 47. Bielańska-Osuchowska Z. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reprod Biol*. 2006;6:161-93.
 48. Hyttel P, Viuff D, Fair T, Laurincik J, Thomsen PD, Callesen H, et al. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and perimplantation embryos. *Reproduction*. 2001;122:21-30.
 49. Rurkholder GD, Comings DE, Okada TA. A storage form of ribosomes in mouse oocytes. *Exp Cell Res*. 1971;69:361-71.
 50. Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 2002;123:613-20.
 51. Soom AV, Tanghe S, Pauw ID, Maes D, Kruif A. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod Domest Anim*. 2002;37:144-51.
 52. Tanghe S, Soom AV, Nauwynck H, Coryn M, De Kruif A. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. *Mol Reprod Dev*. 2002;61:414-24.
 53. Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Hosseini SM, Karimi I. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. *Small Rumin Res*. 2007;68:291-5.
 54. Mattioli M, Barboni B. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus-oocyte complex. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;161:19-23.
 55. Russell DL, Salustri A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Semin Reprod Med*. 2006;24:217-27.

Recebido em: 08/02/12

Aceito em: 22/11/12

CARACTERÍSTICAS DA FORRAGEM QUE IMPLICAM NO COMPORTAMENTO E CONSUMO DE RUMINANTES

Luiz Carlos Vieira Junior¹
Luciano da Silva Cabral²
Marco Aurélio Factori³
Felipe Azevedo Ribeiro⁴
Mário de Beni Arrigoni⁵
Ciniro Costa⁶

RESUMO

Pesquisas sobre o manejo do pastejo pelos animais têm sido realizadas com o objetivo de encontrar o ponto ótimo para utilização das forragens, de modo a visar a melhor resposta animal. Tendo em vista, que o consumo é consideravelmente relacionado pela oferta de forragem, quanto maior a produção de massa seca, maior tende a ser a capacidade de suporte, que se refere ao número ou carga animal que a forragem poderá atender, assegurando ganho por animal e rendimento por área satisfatório. Sobretudo, a adequada ingestão desta forragem deve ocorrer, principalmente em termos de ambiência e comportamento animal. Assim, o objetivo desta revisão é discorrer sobre os efeitos da massa de forragem em relação ao consumo, desempenho e comportamento animal em pastejo.

Palavras-chave: bem estar animal, ganho de peso, pastejo, produtividade

ACCUMULATION OF FORAGE AND ITS PERFORMANCE IN ANIMAL PRODUCTIVITY

ABSTRACT

Research on the management of grazing by animals has been performed in order to find the optimum point for the use of fodder, which aims to better animal performance, in order that the consumer is profoundly determined by the supply of forage. The higher the dry matter yield of pasture may be greater carrying capacity, which refers to the number or stocking that can meet the forage, ensuring high gain per animal and output per area beyond the maintenance of its continuity. Especially adequate intake of this forage should occur, particularly in terms of ambiance and animal behavior. The objective of this review is to discuss the effects of herbage mass in relation to consumption, performance and behavior of the grazing animal.

Keywords: grazing, productivity, weight gain, welfare

¹ Doutorando do Programa de Pós Graduação em Zootecnia da FMVZ/Unesp/Botucatu-SP

² Prof. Dr. da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária/UFMT/Cuiabá/MT

³ Pós doutorando Dep. Melhoramento e Nutrição Animal - Unesp/Botucatu

⁴ Mestrando do Programa de Pós Graduação em Zootecnia da FMVZ/Unesp/Botucatu-SP

⁵ Prof. do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ/Unesp/Botucatu-SP

ACCUMULATION OF FORAGE AND ITS PERFORMANCE IN ANIMAL PRODUCTIVITY

RESUMEN

La investigación sobre la gestión de pastoreo por los animales se han realizado con el fin de encontrar el punto óptimo para el uso de forraje con el fin de aspirar a la respuesta más alta de los animales. Teniendo en cuenta que el consumo está significativamente relacionada con el suministro de forraje. Cuanto mayor es la masa seca, tiende a aumentar la capacidad de carga, lo que se refiere al número o de la media de forrajes puede responder, y la disponibilidad de ganancia por animal y por área de producción satisfactoria. Por encima de todo, la ingesta adecuada de este forraje debe ocurrir, sobre todo en términos de comportamiento de ambiente y de los animales. El objetivo de esta revisión es analizar los efectos de la masa de forraje en relación al consumo, el rendimiento y el comportamiento del animal en pastoreo.

Palabras clave: bienestar, el aumento de peso, el pastoreo, la productividad

INTRODUÇÃO

As pesquisas sobre o manejo do pastejo dos animais têm sido realizadas com o objetivo de encontrar o ponto ótimo entre a necessidade da planta forrageira, no sentido de conservar sua área foliar, conciliando com a necessidade de remoção desse tecido pelo corte ou pastejo para a manutenção da produção animal (1).

Ainda, em condições de pastejo, o acúmulo de massa na pastagem origina-se do resultado do balanço entre crescimento, senescência e o material consumido pelos animais (2). Porém, pode ser resultante de interações de fatores genéticos da espécie forrageira e os efeitos do ambiente sobre seus processos fisiológicos e características morfofisiológicas.

O crescimento de plantas superiores é limitado pela quantidade de luz absorvida pelos tecidos fotossintetizantes e que, quando o suprimento de água e minerais é garantido, o crescimento máximo ocorre quando toda luz incidente é interceptada pelo dossel (3). De acordo com Lemaire e Chapman (4), a eficiência de absorção da luz é condicionada em parte pelos componentes estruturais do dossel, principalmente pelo índice de área foliar.

Em geral, aumentos no índice de área foliar determinam acréscimos na interceptação de luz e consequentemente nas taxas fotossintéticas. Embora, a eficiência fotossintética do tecido foliar possa ser afetada pela densidade de população de perfilhos e pela distribuição de folhas de diferentes idades no dossel, a produção de assimilados não é uma simples função da área foliar (5).

O padrão de desfolhação também exerce efeito sobre o crescimento da planta ou da capacidade de rebrota da forrageira, características estas responsáveis pela produtividade e pela perenidade da cobertura vegetal, dois pontos de suma importância em sistemas de produção de ruminantes em pasto (6).

Assim, o objetivo desta revisão é discorrer sobre os efeitos da massa de forragem em relação ao consumo e comportamento animal em pastejo.

Massa de forragem e desempenho animal

A forrageira é formada por uma população de plantas, em que cada uma é composta, no caso de gramíneas, por perfilhos (7). O acúmulo de massa da forrageira é ditado pelo somatório de massa de cada unidade de perfilho, onde cada um possui sua própria dinâmica de produção de folhas com período limitado de vida. Ainda, o perfilho é a unidade básica de produção de uma gramínea, e caracteriza-se essencialmente por um ponto de crescimento

envolvido pela bainha das folhas que crescem a partir dele, e tendo a capacidade para desenvolver novas gerações de perfilhos a partir de brotos na base das folhas individuais (8). A morfologia do perfilho de uma gramínea é determinada pelo tamanho, número e arranjo espacial dos fitômeros. Um fitômero é constituído por lamina foliar, lígula, bainha, entrenó, nó e gema auxiliar, embora para alguns autores as raízes também façam parte de um fitômero (9).

A formação e o desenvolvimento de sucessivos fitômeros estão relacionados com o processo de morfogênese, pois a quantidade de massa acumulada em cada perfilho é dependente da taxa de aparecimento foliar, da taxa de expansão destas folhas, do seu tamanho final e da duração de vida das mesmas (10).

O potencial de perfilhamento do genótipo de uma forrageira é correlacionado principalmente à sua capacidade de emissão de folhas, pois cada folha formada corresponde à geração de uma gema axilar, o que explica o papel central do aparecimento foliar na morfogênese e no acúmulo de biomassa por área (9).

A produção de novas folhas em um perfilho individual envolve um período de ativa expansão, maturidade, senescência e morte, caso não ocorra sua remoção pelo ato do pastejo e/ou corte. O número de folhas por perfilho é relativamente constante para cada espécie, sendo o seu tempo de vida limitado, condicionado por características genéticas e influenciado por fatores de ambiente, adubação e manejo (11). Adicionalmente Corsi et al. (12) indicaram que o número médio de folhas por perfilho, no equilíbrio entre o aparecimento e senescência, é de 5 a 7 folhas em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, e que o intervalo de aparecimento entre folhas variou de 5,3 a 6,7 dias/folha.

Sobretudo, o equilíbrio entre o surgimento e a mortalidade de perfilhos é fortemente dependente do regime de desfolhação de sua consequência sobre a arquitetura do dossel. Práticas de manejo que induzem substancial alteração na arquitetura do dossel mediante o processo de colheita pelo animal, normalmente se relacionam a uma pequena quantidade de tecidos remanescentes, influenciando diretamente na interceptação luminosa, culminando em variações significativas no acúmulo de forragem (1).

Em algumas gramíneas temperadas, a taxa de acúmulo de forragem máxima foi quando se atingiu cerca de 95% de interceptação luminosa pelo dossel. Entretanto, verificaram aumento no acúmulo de forragem em pastagens de *Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça, mesmo após a máxima interceptação de luz pelo dossel (13). O fato foi justificado pelo efeito do crescimento com orientação vertical das folhas e pelo aumento na proporção de hastes.

Contudo, variações na arquitetura do dossel por conta de diferentes padrões de desfolha não resultam necessariamente em modificações no acúmulo de forragem, especialmente, devido aos eventos compensatórios que existem na planta, mais especificamente entre as taxas de produção e senescência de tecidos (14).

Além dos atributos da arquitetura foliar peculiares de cada espécie, o mecanismo denominado plasticidade fenotípica desempenha papel primordial na adaptação das plantas perante o ambiente, caracterizado por mudanças estacionais e reversíveis na estrutura do dossel (15). Inclui-se como exemplos, alterações na inclinação, tamanho de folhas e no perfilhamento. Estes processos de forma geral estão relacionados ao estresse hídrico, à adubação nitrogenada, mas principalmente referem-se ao manejo de pastejo, especificamente em resposta a frequência e intensidade de desfolhas (16).

A abundância da forragem presente na pastagem influi em melhor resposta animal, tendo em vista, que o consumo é profundamente determinado pela oferta de forragem, sendo que esta varia inversamente com a taxa de lotação. Contudo, quanto maior a produção de massa seca (MS) do pasto maior poderá ser sua capacidade de suporte, que se refere ao número e/ou carga animal que a forragem poderá atender, assegurando alto ganho por animal e elevado rendimento por área além da manutenção da sua perenidade.

Quando a relação entre o número de unidades de consumo de forragem e a quantidade de MS de forragem por unidade de área, em um ponto qualquer no tempo é baixa, o animal é favorecido pela maior disponibilidade de MS. Logo, tem a oportunidade de exercer o pastejo seletivo e obter uma dieta de qualidade superior. Como consequência tem-se uma resposta animal máxima, referente às condições da pastagem oferecida.

Por outro lado, ofertas de forragem limitantes implicam na redução do desempenho individual animal, em virtude principalmente da capacidade limitada de seleção do material ingerido. Contudo, incorrem em sucessivos aumentos na produção por hectare. Entretanto, esse aumento ocorre até um nível máximo a partir do qual a produção por área é minimizada, momento em que a disponibilidade passa a ser tão limitante, na qual a demanda animal por forragem é superior àquela produzida pela pastagem. Assim, ocorre restrição no consumo, de maneira que a ingestão de nutrientes seja apenas para o atendimento das necessidades de manutenção do animal.

O desempenho individual dos animais apresenta relação direta com o aspecto qualitativo da pastagem, enquanto o número de animais por unidade de área expressa o aspecto quantitativo. Neste sentido, a faixa de amplitude adequada de utilização das pastagens, que permite uma produção forrageira máxima aliada à otimização da resposta animal, sem, no entanto prejudicar o equilíbrio entre as espécies que integram a pastagem é definida como intensidade ótima de pastejo (17).

Trabalhos realizados avaliando a resposta animal em relação à variação na quantidade de forragem disponível aos animais demonstraram que valores de oferta, massa de forragem e/ou altura do dossel que maximizam o ganho individual são diferentes daqueles que expressam o máximo ganho por área. Normalmente esta quantidade de forragem é expressa de algumas maneiras, sendo as mais utilizadas: oferta de forragem (kg MS/100 kg de peso vivo (PV), massa de forragem (kg/ha MS) e altura do dossel (cm)) (18).

Consumo de forragem por ruminantes em pastejo

Para que os animais possam desempenhar suas atividades fisiológicas de modo a atender às suas necessidades para manutenção e produção, é imprescindível adequada ingestão de nutrientes (19). Segundo Mertens (20), o consumo corresponde entre 60 a 90% da variação do desempenho animal, sendo apenas 10 a 40% ligados a fatores relacionados com a digestibilidade da dieta.

Dietas ou alimentos podem ser qualificados quanto aos seus valores, nutritivo e alimentício (21). O termo valor nutritivo considera os seguintes fatores: concentração e digestibilidade dos nutrientes e natureza dos produtos digeridos, que sob condições de pastejo são inerentes à forragem consumida (22). Portanto, não devendo incluir qualquer referência ao consumo voluntário, exceto em ocasiões onde a forragem é fornecida em quantidade restrita, onde o valor nutritivo assume especial importância. Por outro lado, o termo valor alimentício apresenta melhor coerência para a avaliação biológica dos alimentos destinados à produção animal, pois engloba além dos aspectos relacionados ao valor nutritivo, os fatores relativos ao potencial de consumo do alimento (22), que de maneira especial assume relevância em sistemas de produção com base na utilização de forragem.

Os principais fatores que influenciam o consumo de forragem por animais em pastejo, podem ser agrupados em duas categorias: fatores nutricionais e não nutricionais (23).

Os fatores não nutricionais, podem também ser denominados de fatores comportamentais, e determinam a influência da disponibilidade de forragem no comportamento ingestivo, mediante variáveis que afetam a taxa de ingestão de forragem (24). Assim, características estruturais do dossel forrageiro (altura, densidade), disponibilidade de forragem, comportamento social dos animais, relevo, clima, proximidade de fontes de água, dentre outros, assumem relevância no processo de colheita da forragem.

Já os fatores vinculados a aspectos nutricionais dão-se por dois mecanismos básicos: físico e fisiológico (20). Fisicamente, o consumo voluntário pode ser inibido pela distensão do compartimento retículo-rúmen, quando a dieta é composta basicamente de forragem de lenta taxa de digestão e, que conseqüentemente, afeta a sua passagem pelo rúmen, o que implica na limitação ou redução no consumo (25). Tal limitação pode estar associada ao teor de fibra em detergente neutro (FDN) da dieta, sendo sugerido o valor de 1,25% do PV de FDN como um possível fator limitante ao consumo (20). Ruminantes mantidos em regime de pastejo em forrageiras tropicais terão seu consumo limitado pelo “enchimento” físico do rúmen.

Entretanto, quando os animais são alimentados com dietas palatáveis, baixas em capacidade de enchimento e prontamente digestíveis, o consumo passa a ser regulado a partir da demanda energética do animal. Todavia, forragens de alta digestibilidade podem ser potencialmente ingeridas em quantidades menores que as preditas pela teoria do controle físico. Nesses casos, o consumo é, então, mais provavelmente controlado por entraves metabólicos.

Princípios do comportamento animal sob condição de pastejo

Para ruminantes, alguns fatores além da abundância de forragem, são determinantes na escolha do local de pastejo, como os atributos relativos aos custos energéticos gastos na busca pelo alimento e a distância em relação às fontes de água (26). Por outro lado, locais de topografia irregular, a presença de parasitas e plantas com compostos antinutricionais ou aleloquímicos podem causar rejeição aos animais (27). Além disso, as habilidades comportamentais são em grande parte adquiridas em processos de aprendizado durante a vida do animal. Ademais, tais habilidades podem ser influenciadas pelo convívio social (28). O fato é que, para realizar o processo de colheita de forragem, os ruminantes acabam por gerar desuniformidades no ambiente de pastejo.

Ovinos em pastejo mantêm um comportamento social típico de explorar preferencialmente locais em que, a altura da forrageira não exceda às suas próprias, de modo a permitir perfeita visualização dos animais do grupo (29).

Outra característica peculiar da espécie ovina é o hábito de pastejarem em grupos, geralmente ocorrendo redução do período de pastejo para grupos pequenos (30). Logo, este comportamento grupal é determinante da frequência e direção do deslocamento dos animais durante o pastejo, contrariamente àquele apresentado pelos bovinos, para os quais a quantidade e qualidade da forragem disponível exercem papel preponderante na escolha do sítio de pastejo (31).

Para ruminantes, o processo de pastejo adquire um caráter ainda mais complexo, uma vez que esses animais são dotados de uma capacidade inata de aprendizado, a qual se baseia no desenvolvimento de uma memória de referência (14), com duração de cerca de 20 dias. Além disso, possuem a capacidade de associar sensações de bem e de mal-estar a um determinado tipo de forragem consumida em um período de até oito horas (27), alterando sua preferência e, portanto, sua capacidade de escolha e seleção de novos sítios e estações de pastejo.

Locais na pastagem que permitem ao animal manter uma taxa elevada de ingestão de nutrientes são memorizados para que sejam utilizados frequentemente (14), o que faz com que o pastejo seja realizado consistentemente em locais onde a qualidade da forragem em oferta seja superior à qualidade média da forragem disponível em área total (32).

Dessa maneira, existe a necessidade de se conhecer não apenas os requisitos nutricionais, mas também os padrões de comportamento animal para que práticas de manejo eficientes e eficazes possam ser implementadas deixando clara, a importância do ambiente social no processo de pastejo (17).

Bovinos e ovinos normalmente dividem o seu dia em períodos alternados de pastejo, ruminação e descanso (ócio). A maior parte da atividade de pastejo ocorre durante o dia, embora sejam comuns períodos curtos de pastejo noturno, notadamente em dias muito quentes, como meio de tentar compensar a redução do pastejo diurno (33). Normalmente existe um período de ruminação após cada período de pastejo, mas a maior parte da ruminação ocorre durante a noite. Este padrão característico pode ser alterado por atividades de rotina como ordenha, mudança de piquetes em situações de lotação rotacionada e, excepcionalmente, por condições extremas de clima (29).

O consumo de forragem por ruminantes é maximizado quando a oferta de MS é de três a quatro vezes superior à quantidade consumida (34) ou 8 a 10 % do peso vivo do animal, partindo do pressuposto que um animal com consumo de MS em torno de 2,5% do PV de MS.

Os ovinos apresentam preferência por forrageira de menor porte em contraposição àquela priorizada por bovinos. Contudo, quando maiores alturas da planta forrageira estão associadas ao desenvolvimento reprodutivo ou à maturação, caracterizada por elevados teores de FDN e lignina, os animais sob pastejo são capazes de diferenciá-la de outras mais tenras (8, 35).

A vegetação numa pastagem é espacialmente heterogênea, principalmente quando se utiliza manejo com lotação contínua (36), por vezes, apresenta substancial amplitude de condições no que diz respeito à massa de forragem, estrutura e altura do dossel. De uma maneira geral, quanto maior a massa de forragem no sítio de pastejo, maior será a massa do bocado realizado pelo animal, possibilitando com isso, maior consumo de forragem, uma vez que a massa do bocado é um dos principais determinantes do nível de ingestão de animais em pastejo (37).

Geralmente os animais pastejam em locais onde a massa de forragem é superior à média, o que permite maior nível de seleção e com isto, ingestão de forragem de melhor qualidade (38). Por outro lado, em condições de baixa taxa de lotação, os animais repetiram o mesmo local já intensamente pastejado, no sentido de aproveitar uma forragem de melhor qualidade (39). Assim, locais pastejados e não pastejados se desenvolvem, configurando uma heterogeneidade espacial na pastagem que pode estar seguramente relacionado com perdas de forragem (40).

Neste contexto, a preferência dos animais por determinadas áreas da pastagem não afeta apenas a qualidade de sua dieta, mas também exerce significativo efeito na estabilidade da comunidade vegetal (41). Todavia, locais com níveis variados de utilização mudam de acordo com a estação do ano, método e pressão de pastejo.

Uma vez escolhido o sítio de pastejo pelo animal, a quantidade e a duração das refeições assumem importância ao longo do tempo. A atividade de pastejo envolve turnos. O número de refeições parece ser um indicador de qualidade do ambiente pastoril, uma vez que em situações de elevada oferta de forragem, os animais realizam um número grande de refeições de curta duração, caracterizadas por altas taxas de ingestão (42). Entretanto, o tempo total de pastejo tende a ser reduzido.

Em situações de massa de forragem restritivas ao pastejo seletivo, o número de refeições é menor e o tempo por refeição é aumentado. Deste modo, maior tempo é despendido com pastejo, em virtude de uma taxa de ingestão limitada pela estrutura do pasto e um ambiente de pastejo estressante para a colheita da forragem. O número total de refeições, combinado às suas respectivas durações, determinam o tempo diário de pastejo, uma variável que indica as condições do pasto (43).

Na medida em que o consumo diário de forragem corresponde ao somatório de cada ação de captura de forragem pelo bocado, a maximização do consumo e, conseqüentemente, do desempenho animal, é obtida a partir da maximização de cada bocado desferido (44). Nesse contexto, a massa do bocado é a principal variável determinante do consumo diário de forragem, a qual é fortemente influenciada pela profundidade do bocado (45), uma vez que a

área do bocado é menos sensível às variações em massa de forragem e, ou, altura do dossel. Contudo, Mitchell, Hodgson e Clark (46) destacaram que variações na altura do dossel geram uma amplitude maior de variação em massa do bocado, indicando a importância da altura do dossel como uma referência de manejo e controle do processo de pastejo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O manejo adequado da pastagem pode influenciar na produtividade animal, aumentando a eficiência na utilização da forragem. Para obtenção de melhores desempenhos produtivos baseados em sistema de pastagens, é indispensável à adequação de manejos que integram a otimização do consumo de forragem pelo animal, bem como seu bem estar e disponibilidade de forrageira de qualidade para que este possa desempenhar seu potencial produtivo.

REFERÊNCIAS

1. Sarmento DOL. Produção, composição morfológica e valor nutritivo da forragem em pastos de *Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. Rich) Stapf cv. Marandu submetidos a estratégias de pastejo rotativo por bovinos de corte [tese]. São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo; 2007.
2. Pedreira BC, Pedreira CGS, Silva SC. Estrutura do dossel e acúmulo de forragem de *Brachiaria brizantha* cultivar Xaraés em resposta a estratégias de pastejo. *Pesqui Agropecu Bras.* 2007;42:281-7.
3. Braga GJ. Assimilação de carbono, acúmulo de forragem e eficiência de pastejo em pastagens de capim-Marandu [*Brachiaria brizantha* (Hochst ex A.RICH.) STAPF.] em resposta à oferta de forragem [tese]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo; 2004.
4. Lemaire G, Chapman D. Tissue flows in grazed plant communities. In: Hodgson J, Illius AW, editors. *The ecology and management of grazing systems*. Oxon: CABI; 1996. p.3-36.
5. Pedreira BC. Interceptação de luz, arquitetura e assimilação de carbono em dosséis de capim xaraés [*Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf. Cv. Xaraés] submetidos a estratégias de pastejo rotacionado [dissertação]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo; 2006.
6. Grant SA, Barthram GT, Torvell L, King J, Elston DA. Comparison of herbage production under continuous stoking and intermittent grazing. *Grass Forage Sci.* 1999;43:29-39.
7. Matthews PNP, Harrington KC, Hampton JG. Management of grazing systems. In: White J, Hodgson J, editors. *New Zealand pasture and crop science*. Auckland: Oxford University Press; 1999. p.153-74.
8. Griffiths WM, Hodgson J, Arnold GC. The influence of sward canopy structure on foraging decisions by grazing cattle. I. Patch selection. *Grass Forage Sci.* 2003;58:112-24.
9. Nascimento Júnior D, Adese B. Acúmulo de forragem na pastagem. In: *Anais do 2º Simpósio sobre manejo estratégico de pastagens; 2004, Viçosa. Viçosa: UFV; 2004. p.289-330.*

10. Nabinger C, Pontes LS. Morfogênese de plantas forrageiras e estrutura do pasto. In: Anais da 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2001, Piracicaba. Piracicaba: SBZ; 2001. p.755-71.
11. Carnevalli RA, Da Silva SC. Validação de técnicas experimentais para avaliação de características agrônomicas e ecológicas de pastagens de *Cynodon Dactylon* cv. Coastcross. *Sci Agric*. 1999;56:489-99.
12. Corsi M, Balsalobre MA, Santos PM, Silva SC. Bases para o estabelecimento do manejo de pastagens de braquiária. In: Anais do 11º Simpósio sobre Manejo da Pastagem; 1994, Piracicaba. Piracicaba: FEALQ; 1994. p.15-48.
13. Gomide CAM, Gomide JA, Paciullo DS, Alexandrino E. Características estruturais e produtivas da pastagem de capim-Mombaça sob diferentes períodos de descanso do pastejo rotacionado (compact disc). In: Anais da 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2002, Recife. Recife: SBZ; 2002.
14. Bailey DW, Gross JE, Laca EA, Rittenhouse LR, Coughenour MB, Swift DM, et al. Mechanisms that result in large herbivore grazing distribution patterns. *J Range Manage*. 1996;49:386-400.
15. Matthew C, Van Loo EN, Thom ER. Understanding shoot and root development. In: Gomide JA, editor. Proceedings of the 19º International Grassland Congress; Piracicaba. Piracicaba: FEALQ; 2001. p.19-27.
16. Nelson CJ. Shoot morphological plasticity of grasses: leaf growth vs. tillering. In: Lemaire G, Hodgson J, Moraes A, Nabinger C, Carvalho PCF, editors. Grassland ecophysiology and grazing ecology. New York: CAB International; 2000. cap.6, p.101-26.
17. Da Silva SC. Comportamento animal e pastejo. In: Anais do 23º Simpósio sobre Manejo de Pastagem; 2006, Piracicaba. Piracicaba: FEALQ; 2006.
18. Heringer I, Carvalho PCF. Ajuste da carga animal em experimentos de pastejo: uma nova proposta. *Cienc Rural*. 2002;32:675-9.
19. Gomide JA. Os volumosos na alimentação de vacas leiteiras. In: Peixoto AM, Moura JC, Faria VP, editores. Nutrição de bovinos: conceitos básicos e aplicados. Piracicaba: FEALQ; 1995. p.223-38.
20. Mertens DR. Regulation of forage intake. In: Fahey Jr GC, editor. Forage quality, evaluation and utilization. Madison: American Society of Agronomy; 1994. p.450-93.
21. Gomide JA, Queiroz DS. Valor alimentício das Brachiarias. In: Anais do 11º Simpósio de Manejo de Pastagens; 1994, Piracicaba. Piracicaba: FEALQ; 1994. p.223-48.
22. Reis RA, Teixeira IAMA, Siqueira GR. Impacto da qualidade da forragem na produção animal. In: Anais da 43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2006, João Pessoa. João Pessoa: SBZ; 2006.
23. Poppi D, McLennan SR, Bediye S, Vega A, Zorrilla-Rios J. Forage quality: strategies for increasing nutritive value of forages. In: Proceedings of the 18th International Grassland

- Congress; 1997, Winnipeg and Saskatoon. Calgary, Canada: Association Management Center; 1997. p.307-22.
24. Hodgson J. Grazing management: science into árctice. New Zeland: Longman Scientific & Technical; 1990.
 25. Allen MS. Physical constrains on voluntary intake of herbages by ruminants. *J Anim Sci.* 1996;74:3063-75.
 26. Goulart RCD. Mecanismos envolvidos na escolha de locais de pastejo por bovinos de corte [dissertação]. Piracicaba: Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo; 2006.
 27. Launchbaugh KL. Biochemical aspects of grazing behaviour. In: Hodgson J, Illius AW, editors. *The ecology and management of grazing systems.* Wallingford: CABI Publishing; 1996. p.159-84.
 28. Mirza SN, Provenza FD. Preference of the mother affects selection and avoidance of foods by lambs differing in age. *Appl Anim Behav Sci.* 1990;28:255-63.
 29. Santos PM. Controle do desenvolvimento das hastes no capim Tanzânia: um desafio [tese]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo; 2002.
 30. Penning PD, Parsons AJ, Newman JA, Orr RJ, Harvey A. The effects of group size on grazing time in sheep. *Appl Anim Behav Sci.* 1993;37:101-9.
 31. Carvalho PCF, Prache S, Damasceno JCO. Processo de pastejo: desafios da procura e apreensão da forragem pelo herbívoro. In: Penz Junior AM, Afonso LOB, Wassermann GJ. *Anais da 36º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia;* 1999, Porto Alegre. Porto Alegre: SBZ; 1999. p.253-68.
 32. Carvalho PCF, Prache S, Roguet C, Louault F. Defoliation process by ewes of reproductive compared to vegetative swards [CD-ROM]. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on the Nutrition of Herbivores;* 1999, San Antonio. San Antonio, USA: American Society of Animal Science; 1999.
 33. Medeiros RB, Pedroso CES, JornadaJBJ, Silva MA, Saibro JC. Comportamento ingestivo de ovinos no período diurno em pastagem de azevém anual em diferentes estágios fenológicos. *Rev Bras Zootec.* 2007;36:198-204.
 34. Gibb MJ, Treacher TT. The effect of herbage allowance on herbage intake and performance of lambs grazing perennial ryegrass and red clover swards. *J Agric Sci.* 1976; 86:355-65.
 35. Griffiths WM, Hodgson J, Arnold GC. The influence of sward canopy structure on foraging decisions by grazing cattle. II. Regulation of bite depth. *Grass Forage Sci.* 2003;58:125-37.
 36. Hirata M. Herbage availability and utilization in small-scale patches in a bahia grass (*Paspalum notatum*) pasture under cattle grazing. *Trop Grassl.* 2002;36:13-23.

37. Da Silva SC, Carvalho PCF. Foraging behaviour and herbage intake in the favourable tropics/sub-tropics. In: McGilloway DA, editor. Proceedings of the 20^o International Grassland Congress: Grassland - a global resource; 2005, Dublin. Dublin, Ireland: IGC; 2005. p.81-95.
38. Laca EA, Demment MW. Herbivory: the dilemma of foraging in a spatially heterogeneous food environment. In: Palo RT, Robbins CT, editors. Plant defenses against mammalian herbivory. Boca Raton: CRC; 1991. p.29-44.
39. Cid MS, Brizuela MA. Heterogeneity in tall fescue pastures created and sustained by cattle grazing. *J Range Manage.* 1998;51:644-9.
40. Carvalho PCF, Canto MW, Moraes A. Fontes de perdas de forragem sob pastejo: forragem se perde? In: Anais do 2^o Simpósio sobre Manejo Estratégico da Pastagem; 2004, Viçosa. Viçosa: UFV; 2004. p.387-418.
41. Rook AJ. Principles of foraging and grazing behaviour. In: Hopkins A, editor. Grass its production and utilization. Oxford: Blackwell Science Ltda; 2000. p.229-46.
42. Carvalho PCF, Genro TCM, Gonçalves EN. A estrutura do pasto como conceito de manejo: reflexos sobre o consumo e a produtividade. In: Reis RA, Bernardes TF, Siqueira GR, Moreira AL, editores. Volumosos na produção de ruminantes. Jaboticabal: Funep; 2005. p.107-24.
43. Hodgson J, Illius AW, Jessop NS. Metabolic constraints on voluntary intake in ruminants. *J Anim Sci.* 1996;74:3052-62.
44. Carvalho PCF, Moraes A. Comportamento ingestivo de ruminantes: bases para o manejo sustentável do pasto [CD-ROM]. In: Anais do 1^o Simpósio sobre Manejo Sustentável das Pastagens; 2005, Maringá. Maringá: UEM; 2005.
45. Carvalho PCF. A estrutura da pastagem e o comportamento ingestivo de ruminantes em pastejo. In: Jobim CC, Santos GT, Cecato U, editores. Anais do 1^o Simpósio sobre Avaliação de Pastagens com Animais; 1997, Maringá. Maringá-PR: Cooper Graf. Artes Gráficas Ltda; 1997. p.25-52.
46. Mitchell RJ, Hodgson J, Clark DA. The effect of varying leafy sward height and bulk density on the ingestive behaviour of young deer and sheep. In: Tarry A, editor. Proceedings of the 51th New Zealand Society of Animal Production; 1991. p.159-66.

Recebido em: 28/02/12

Aceito em: 27/11/12

HEPATOZOONOSE CANINA NO BRASIL: ASPECTOS DA BIOLOGIA E TRANSMISSÃO

Larissa de Castro Demoner¹
João Marcelo Azevedo de Paula Antunes²
Lucia Helena O'Dwyer³

RESUMO

A hepatozoonose canina é uma hemoparasitose causada por protozoários do gênero *Hepatozoon* e transmitida por carrapatos. Duas espécies são descritas por causar doença em cães, *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum*. Pesquisas comprovaram que *H. canis* é o agente causador da enfermidade no Brasil. *Rhipicephalus sanguineus* é considerado o vetor biológico, no qual o parasita desenvolve a fase sexuada do ciclo biológico. Em nosso país, os relatos da doença são frequentes em animais que vivem em áreas rurais. Cães de áreas rurais provavelmente compartilham o ambiente com outros hospedeiros domésticos e selvagens, e por isso são infestados principalmente por carrapatos *Amblyomma* spp. Assim, diversas pesquisas têm sido conduzidas a fim de identificar o carrapato transmissor da doença no Brasil. É sugerido que *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma ovale* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* possam atuar como potenciais vetores, porém nenhum estudo realizado até o momento foi capaz de confirmar essa hipótese. Outros mecanismos de transmissão devem ser investigados em relação ao ciclo evolutivo de *H. canis*, como por exemplo, a predação de hospedeiros paratênicos. Este tipo de transmissão é descrito em espécies de *Hepatozoon* que infectam répteis e anuros, e pode ser que seja um caminho alternativo na transmissão de *Hepatozoon* sp. a cães.

Palavras-chave: *Hepatozoon canis*, cães, transmissão, carrapatos.

CANINE HEPATOZOONOSIS IN BRAZIL: ASPECTS OF THE BIOLOGY AND TRANSMISSION

ABSTRACT

Canine hepatozoonosis is a hemoparasitosis caused by protozoa of the genus *Hepatozoon* and transmitted by ticks. Two species are described to cause disease in dogs, *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum*. Studies have shown that *H. canis* is the causative agent of the disease in Brazil. *Rhipicephalus sanguineus* is considered the biological vector, in which the parasite develops the sexual phase of life cycle. In our country, the reports of *H. canis* are common in animals that live in rural areas. Dogs from rural areas likely share the environment with other domestic and wild hosts and so are mainly infested by ticks *Amblyomma* spp. Thus, many studies have been conducted to identify the tick that transmits the disease in Brazil. It is suggested that *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma ovale* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* may act as potential vectors but no study has confirmed this hypothesis so far. Other transmission mechanisms should be investigated in

¹ Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP/Botucatu, SP.

² Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista – UNESP/Botucatu, SP.

³ Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP/Botucatu, SP.

Correspondência: Larissa de Castro Demoner. Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências (UNESP). Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior, S/N – CEP: 18618-970 – Botucatu/SP. Telefone: (14) 3811-6239. Email: larissademoner@hotmail.com.

relation to the life cycle of *H. canis*, such as predation of paratenics hosts. This type of transmission is described in species of *Hepatozoon* that infect reptiles and frogs and it may be an alternative pathway in transmission of *Hepatozoon* sp. to dogs.

Keywords: *Hepatozoon canis*; dogs; transmission; ticks.

HEPATOZOONOSIS CANINA EN BRASIL: ASPECTOS DE LA BIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN

RESUMEN

La hepatozoonosis canina es causada por protozoos del género *Hepatozoon* y transmitida por garrapatas. Dos especies se describen por causar la enfermedad en los perros, *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum*. Los estudios han demostrado que el *H. canis* es el agente causal de la enfermedad en Brasil. *Rhipicephalus sanguineus* es considerado el vector biológico, donde el parásito desarrolla la fase sexuada del ciclo de vida. En nuestro país, los informes de la enfermedad son comunes en los animales que viven en las zonas rurales. Es probable que los perros de las zonas rurales compartan el ambiente con otros huéspedes domésticos y salvajes, por esto son infestados por garrapatas del género *Amblyomma* spp. Por lo tanto, muchos estudios se han realizado para identificar la garrapata que transmite la enfermedad en Brasil. Se sugiere *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma ovale* y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pueden actuar como vectores potenciales, pero ningún estudio hasta ahora ha sido capaz de confirmar esta hipótesis. Otros mecanismos de transmisión deben ser investigado en relación con el ciclo de vida de *H. canis*, tales como la predación hospederios paratenicos. Este tipo de transmisión ya se describió en el ciclo biológico de especies de *Hepatozoon* que infectan reptiles y anuros, y puede ser una vía alternativa en la transmisión de *Hepatozoon* sp. a los perros.

Palabras claves: *Hepatozoon canis*; perros; transmisión; garrapatas.

INTRODUÇÃO

Hepatozoon canis é um hemoparasita transmitido por carrapatos que acomete cães e outros carnívoros em diversas regiões do mundo. *Rhipicephalus sanguineus* é considerado o seu vetor biológico (1). No entanto, é possível que outras espécies atuem como potenciais vetores.

Em nosso país, os estudos epidemiológicos demonstram que as infecções por *H. canis* são comuns entre cães de áreas rurais (2-4). Nesses ambientes, *R. sanguineus* pode ser encontrado em cães em infestações mistas com outras espécies, principalmente do gênero *Amblyomma* (5, 6). Algumas pesquisas apontam diferentes espécies de carrapato como possíveis vetores de *H. canis* em áreas rurais do Brasil, incluindo *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma ovale* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (3, 7-9).

É preciso que estudos detalhados, tanto em condições naturais quanto experimentais, sejam realizados com diferentes espécies de carrapatos, pois até o momento o vetor de *H. canis* no Brasil está indefinido, ou ainda, estudar outras formas de transmissão, como por exemplo, a predação de hospedeiros paratênicos.

REVISÃO DE LITERATURA

Definição e Taxonomia

A hepatozoonose canina é uma enfermidade causada por protozoários do gênero *Hepatozoon* e transmitida por carrapatos. Desde os primeiros relatos, a doença vem sendo descrita em diferentes regiões do mundo (1).

O gênero *Hepatozoon* compreende protozoários do filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Adeleorina e família Hepatozoidae (10).

Atualmente, existem duas espécies de *Hepatozoon* capazes de infectar cães, são elas *H. canis* e *H. americanum* (11). A caracterização genética conduzida com o propósito de identificar a espécie que acomete cães no Brasil comprovou tratar-se de *H. canis* (12).

Breve histórico

A primeira descrição do parasita foi realizada na Índia em células polimorfonucleares de cães (13). No mesmo ano, o protozoário foi observado no citoplasma de leucócitos de cães e então classificado como *Leucocytozoon canis* (14). Posteriormente, sugeriu-se que o nome genérico *Leucocytozoon* fosse substituído por *Hepatozoon*, sendo a partir de então, denominado *Hepatozoon canis* (15).

Christophers (16) identificou o carrapato marrom, *R. sanguineus*, como hospedeiro invertebrado de *H. canis*. No início do século XX, esta espécie foi estudada tanto no cão quanto no hospedeiro invertebrado e foram caracterizados seu ciclo biológico e seu vetor (16-18).

Distribuição geográfica

A hepatozoonose canina causada por *H. canis* é descrita principalmente em regiões tropicais, subtropicais e de clima temperado, sendo sua distribuição diretamente relacionada com a do hospedeiro definitivo (vetor) (1).

Em nosso país, a hepatozoonose canina foi descrita pela primeira vez no Rio de Janeiro por Massard (2) e subsequentemente diagnosticada em outros estados, incluindo Espírito Santo (19), Minas Gerais (20), São Paulo (12, 21), Góias (22), Rio Grande do Sul (23), Brasília (24), Mato Grosso do Sul (25) e Pará (26).

Os estudos epidemiológicos que se seguem no Brasil demonstram alta prevalência de infecção causada pelo parasita, principalmente em cães de áreas rurais. No Rio de Janeiro, foi realizada uma pesquisa com 250 cães de áreas rurais de diferentes localidades, utilizando a técnica de esfregaço sanguíneo, comprovando que a prevalência das infecções por *H. canis* foi alta em algumas regiões, variando de 9,1% a 59,4% (3).

Em Uberlândia, Minas Gerais, Gomes et al. (20) pesquisaram a ocorrência de *Hepatozoon* sp. em cães de área urbana. Dos 300 cães examinados, em apenas 23 (7,66%) foram observados gamontes no esfregaço sanguíneo.

Ciclo biológico

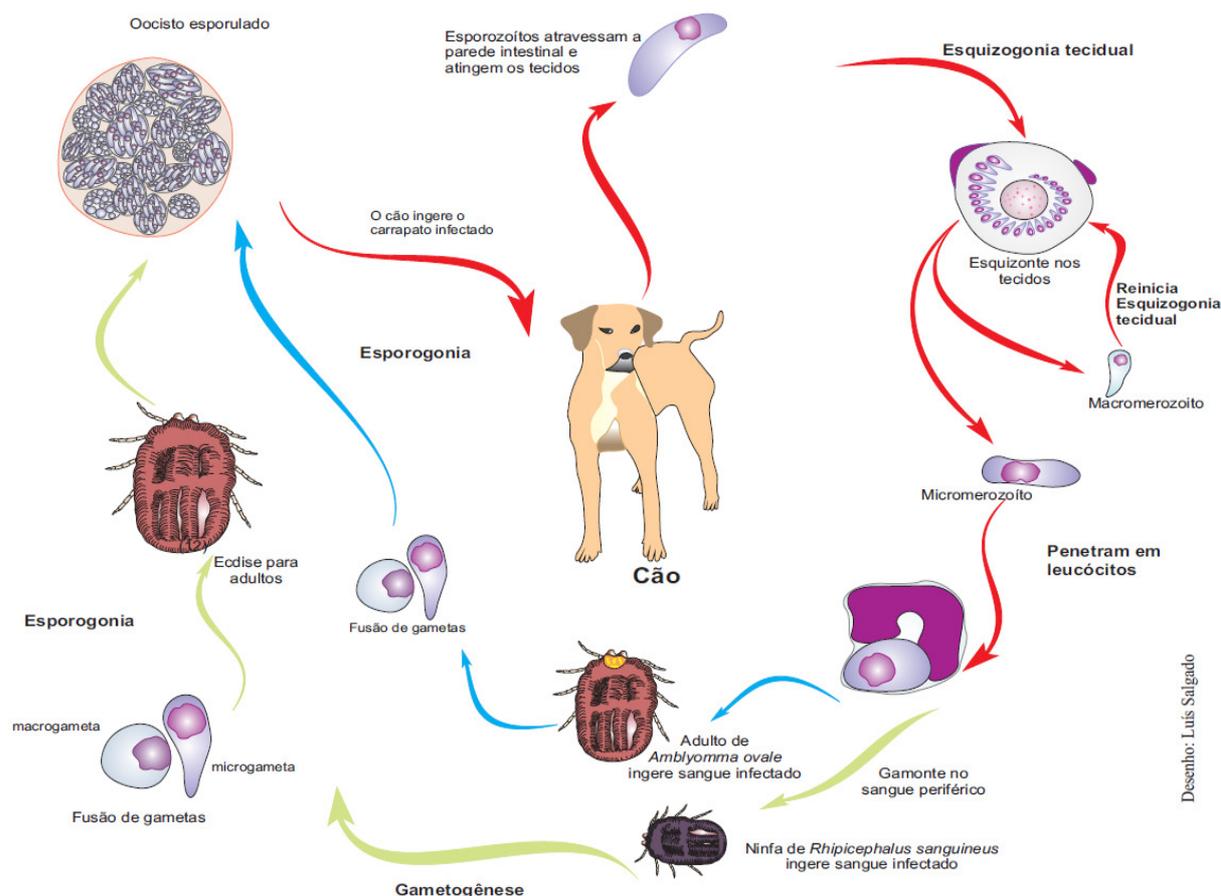
Diferente de outros patógenos transmitidos por carrapatos, cuja via de transmissão é a glândula salivar do artrópode, a transmissão de *Hepatozoon* sp. a cães ocorre pela ingestão de carrapatos contendo oocistos esporulados na hemocele, que se rompem no trato digestivo do animal liberando os esporozoítos. Supõe-se que a ação da bile possa agir na cápsula dos esporocistos para que ocorra a liberação dos esporozoítos. Estes então atravessam a parede intestinal, invadem células do sistema mononuclear e se disseminam por via sanguínea ou linfática para diversos órgãos, mas principalmente medula óssea, baço e linfonodos, onde ocorre a merogonia. Assim, dois tipos de merontes são formados: os macromerontes, contendo de dois a quatro macromerozoítos, e os micromerontes que contêm

aproximadamente 20 a 30 micromerozoítos. Os macromerozoítos liberados do meronte maduro invadem os tecidos e iniciam uma segunda merogonia, dando origem a novas formas merogônicas. Em contrapartida, os micromerozoítos invadem monócitos e neutrófilos e sofrem gametogonia, dando origem aos gamontes circulantes (Figura 1) e completando o ciclo no hospedeiro intermediário, que dura em média 28 dias (1, 27).



Figura 1. Esfregaço sanguíneo de um cão naturalmente infectado por *H. canis*. Gamonte em monócito (seta). (Giemsa, 1000x)

O carrapato se infecta ao se alimentar de sangue contendo gamontes de *H. canis* no interior de neutrófilos e monócitos circulantes, e desta forma tem início a gametogênese e esporogonia. Os gamontes são liberados no intestino, no qual há formação de gametas, que por um processo de singamia dão origem ao zigoto. Este atravessa a parede intestinal, indo localizar-se na hemocele do carrapato onde ocorre a formação do oocisto. Os oocistos, quando maduros, apresentam vários esporocistos [30-50] contendo de sete a 14 esporozoítos, que quando ingeridos darão continuidade ao ciclo (18, 27) (Figura 2).



Desenho: Luís Salgado

Figura 2. Ciclo biológico de *Hepatozoon canis*

Transmissão

A transmissão de *Hepatozoon* spp. a cães ocorre quando estes ingerem carrapatos infectados, nos quais o parasita desenvolve a fase sexuada do ciclo biológico. *R. sanguineus* é considerado vetor biológico de *H. canis* e diversos estudos demonstraram sua capacidade vetorial (17, 27, 28). Nesta espécie de carrapato, *H. canis* é transmitido de forma transtestadial, da ninfa para o estágio adulto (27, 28). A transmissão transovariana não pôde ser demonstrada em condições experimentais (28).

No Brasil, *R. sanguineus* é a principal espécie de carrapato encontrada em cães, sendo amplamente distribuído por todas as regiões e predominante tanto em áreas urbanas e rurais (29, 30). Cães de área rural, por compartilharem o ambiente com outros hospedeiros domésticos e selvagens, são infestados também por espécies de *Amblyomma* (5), particularmente *A. ovale*, *A. cajennense*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma oblongoguttatum* e *Amblyomma tigrinum* (6, 31, 32).

O'Dwyer, Massard e Pereira de Souza (3) estudaram a prevalência de *H. canis* em cães de áreas rurais do Rio de Janeiro. Neste estudo, foram identificadas quatro espécies de carrapatos parasitando cães: *R. sanguineus*, *A. cajennense*, *A. ovale* e *A. aureolatum*. Os dados obtidos revelaram uma associação positiva entre a infestação por *A. cajennense* e as infecções por *H. canis* nos cães, o que levou os autores sugerirem esta espécie de carrapato como possível vetor.

Forlano et al. (7) estudaram a transmissão de *Hepatozoon* spp. em cães de áreas rurais por diferentes espécies de carrapato. Dos espécimes coletados para pesquisa de oocistos, apenas um macho de *A. ovale* apresentou oocistos similares aos de *H. canis*. Além disso, um

cão inoculado por via oral com macerado de *A. ovale* se tornou infectado pelo hemoparasita. Com este resultado, foi sugerido que adultos desta espécie de carrapato poderiam estar envolvidos na transmissão de *H. canis* em áreas rurais do Brasil.

Trabalhando com *A. ovale*, Rubini et al. (8) demonstraram, experimentalmente, a infecção e capacidade vetorial desta espécie de carrapato. Os autores infestaram um cão positivo para *H. canis* com adultos de *A. ovale* e após o desprendimento das fêmeas, parte delas foi utilizada para infecção de cães negativos e as restantes para observação de oocistos na hemocele. Dos carrapatos dissecados, dois apresentaram oocistos na hemocele e dos três cães que se alimentaram com os carrapatos, um se infectou. Os autores discutem que a rápida fase de esporogonia observada em adultos de *A. ovale* quando comparada com *R. sanguineus*, pode se tratar de uma adaptação comportamental do vetor *A. ovale* a fim de permitir o completo ciclo de vida de *H. canis* em áreas rurais, uma vez que no *R. sanguineus* o carrapato se infecta em fase de ninfa e a transmissão ocorre no estágio adulto, enquanto no *A. ovale* a infecção e a transmissão parecem ocorrer apenas na fase adulta. Em condições naturais, somente o estágio adulto de *A. ovale* é encontrado parasitando cães de áreas rurais (33).

Rubini (34) infectou carrapatos *R. sanguineus*, *A. ovale* e *A. cajennense* com *H. canis* a fim de comparar a taxa de infecção entre as diferentes espécies. Somente em fêmeas de *A. ovale* foram observados oocistos, resultado este inesperado, pois *R. sanguineus* é considerado o vetor principal de *H. canis*.

Alguns trabalhos demonstram que existe uma grande variabilidade genotípica e fenotípica dentro do grupo *R. sanguineus* de diferentes regiões geográficas. Burlini et al. (35), por exemplo, ao estudarem a variabilidade genética de *R. sanguineus* em diferentes regiões no Brasil e sua relação com carrapatos do mesmo grupo de diferentes continentes, observaram que há divergência genética no país, mas não o suficiente para se caracterizar espécies diferentes. Também foi demonstrada grande divergência entre isolados do Brasil e de Israel, assim como baixa variabilidade genética entre *R. sanguineus* brasileiro e *R. turanicus* africano. Essas variedades intraespecíficas podem alterar diversos parâmetros biológicos nessa espécie de carrapato, entre eles, a transmissão de patógenos. Portanto, é necessário que mais estudos morfológicos e moleculares sejam realizados a fim esclarecer a biosistemática de *R. sanguineus* de diferentes regiões, contribuindo, desta forma, na compreensão da epidemiologia das doenças transmitidas por este carrapato.

Recentemente em Uberlândia, Minas Gerais, uma fêmea parcialmente ingurgitada de *R. microplus*, que foi coletada de um cão de área rural e naturalmente infectado por *H. canis*, continha oocistos do *Hepatozoon* na hemocele (9). Apesar da importância deste achado, o papel dessa espécie de carrapato na epidemiologia de *H. canis* é questionável, pois apesar de *R. (B.) microplus* ser encontrado parasitando outras espécies de mamíferos além dos bovinos, cães não são hospedeiros preferenciais (36), e, portanto, o seu papel epidemiológico nas infecções por *H. canis* em áreas rurais precisa ser melhor investigado.

Além da transmissão horizontal por carrapatos, foi comprovada também a transmissão congênita de *H. canis* em cães. Murata et al. (37) relataram a ocorrência da transmissão vertical em seis ninhadas, com 23 de 29 cães neonatos (79,3%), que apresentaram gamontes e merontes tissulares, 16 a 60 dias após o nascimento. As cadelas eram infectadas e os filhotes que nasceram foram mantidos livres de carrapatos, confirmando assim esta forma de transmissão.

Apesar da ingestão de oocistos esporulados ser a principal forma de transmissão de *Hepatozoon* spp. para o hospedeiro intermediário vertebrado, o ciclo biológico alternativo de algumas espécies de *Hepatozoon* pode incluir mais de um hospedeiro intermediário, o qual atua também como hospedeiro facultativo (paratênico), que desenvolve nos tecidos uma forma infectante quiescente, os cistozoítos (38). Estas formas infectantes foram demonstradas no ciclo biológico de algumas espécies de *Hepatozoon* que infectam serpentes, lagartos e

anuros. Nesses casos, o hospedeiro intermediário vertebrado se torna infectado ingerindo os cistozoítos presentes no hospedeiro paratênico (38, 39).

Existem evidências que suportam um provável envolvimento da predação na manutenção do ciclo endêmico de *H. canis*. Baneth e Shkap (40) relatam a observação de cistos monozóicos de *H. canis* em baço de cães naturalmente e experimentalmente infectados pelo protozoário. O'Dwyer et al. (21) e Baneth, Samish e Shkap (27) também observaram este tipo de cisto em baço de animais naturalmente e experimentalmente infectados, respectivamente. Segundo os autores, a presença desses cistos em cães pode ser parte de um ciclo de três hospedeiros, descrito por Smith (38), ou pode ser vestígio de um ciclo onde os cães atuavam como hospedeiros de transporte. Além disso, *H. canis* tem sido diagnosticado em diversas espécies de felídeos e canídeos silvestres, os quais sobrevivem de predação (1, 41-43).

No Brasil, os relatos de *H. canis* ocorrem principalmente em áreas rurais (3, 4, 9), onde os cães podem incluir na dieta algumas presas. Em Oklahoma, EUA, Johnson et al. (44) encontraram uma alta prevalência de infecção por *Hepatozoon* spp. em roedores silvestres de uma área endêmica para *H. americanum*. Em nosso país, o que chama a atenção é que larvas e ninfas de *A. ovale*, que até o momento foi a única espécie de carrapato capaz de transmitir *H. canis* a cães (7, 8), se alimentam primariamente em pequenos roedores (33). Portanto, é necessário que se investigue a ocorrência de *H. canis* nesses animais e a possibilidade de servirem como fontes de infecção a carrapatos *A. ovale* e a cães.

Em suma, o que a literatura tem sugerido é que *H. canis* tenha um ciclo natural silvestre, onde mamíferos silvestres seriam os hospedeiros intermediários primários, e os cães teriam sido inseridos nesse ciclo acidentalmente ao ingerirem carrapatos infectados ou hospedeiros paratênicos (45).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil, nos últimos anos, o conhecimento sobre *H. canis* vem se intensificando, mas há muito a ser pesquisado. Os relatos de *H. canis* são frequentes em áreas rurais, onde cães podem ser infestados por diferentes espécies de carrapatos. É necessário que mais pesquisas sejam realizadas a fim de investigar os possíveis vetores ou então comprovar outras formas de transmissão, como a hipótese da predação.

REFERÊNCIAS

1. Baneth G. Perspective on canine and feline hepatozoonosis. *Vet Parasitol.* 2011 Sep 8;181(1):3-11.doi:10.1016/j.vetpar.2011.04.015.
2. Massard CA. *Hepatozoon canis* (James, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora [dissertação]. Seropédica: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1979.
3. O'Dwyer LH, Massard CL, Pereira de Souza JC. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2001;94:143-50.
4. Rubini AS, Paduan KS, Lopes VVAH, O'Dwyer LH. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of São Paulo state, Brazil. *Parasitol Res.* 2008;102:895-9.
5. Labruna MB, Campos Pereira M. Carrapato em cães no Brasil. *Clin Vet.* 2011;30: 24-32.

6. Martins TF, Spolidorio MG, Batista TCA, Oliveira IAS, Yoshinari NH, Labruna MB. Ocorrência de carrapatos (Acari: Ixodidae) no município de Goiatins, Tocantins. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2009;18:50-2.
7. Forlano M, Scofield A, Elisei C, Fernandes KR, Ewing AS, Massard CL. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;134:1-7.
8. Rubini AS, Paduan KS, Martins TF, Labruna MB, O'Dwyer LH. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol.* 2009;164:324-7.
9. Miranda RL, Castro JR, Olegário MMM, Beletti ME, Mundim AV, O'Dwyer LH, et al. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* collected from a naturally infected dog. *Vet Parasitol.* 2011;177:392-6.
10. Mathew JS, Van Den Bussche RA, Ewing SA, Malayer JR, Latha BR, Panciera RJ. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life cycle characters. *J Parasitol.* 2000;86:366-72.
11. Vincent-Johnson NA, Macintire DK, Lindsay DS, Lenz SD, Baneth G, Shkap V, et al. A new *Hepatozoon* species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. *J Parasitol.* 1997;83:1165-72.
12. Rubini AS, Paduan KS, Cavalcante GG, Ribolla PEM, O'Dwyer LH. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. *Parasitol Res.* 2005;97:91-3.
13. Bentley CA. Preliminary note upon a leucocytozoon of the dog. *Br Med J.* 1905; 1:988.
14. James SP. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. *Sci Mem Off Med Sanit Dep Gov India.* 1905;14:1-13.
15. Wenyon CM. Some remarks on the genus *Leucocytozoon*. *Parasitology.* 1910;3:63-72.
16. Christophers SR. The sexual cycle of *Leucocytozoon canis* in the tick. *Sci Mem Off Med Sanit Dep Gov India.* 1907;28:1-14.
17. Christophers SR. *Leucocytozoon canis*. *Sci Mem Off Med Sanit Dep Gov India.* 1906;26:1-18.
18. Christophers SR. The development of *Leucocytozoon canis* in the tick with a reference to the development of *Piroplasma*. *Parasitology.* 1912;5:37-48.
19. Spolidorio MG, Labruna MB, Zago AM, Donatele DM, Caliari KM, Yoshinari NH. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;163:357-61.

20. Gomes PV, Mundim MJS, Mundim AV, Ávila DF, Guimarães EC, Cury MC. Occurrence of Hepatozoon sp. in dogs in the urban area originating from a municipality in southeastern Brazil. *Vet Parasitol.* 2010;174:155-61.
21. O'Dwyer LH, Saito ME, Hasegawa MY, Kohayagawa A. Tissue stages of Hepatozoon canis in naturally infected dogs from São Paulo state, Brazil. *Parasitol Res.* 2004;94:240-2.
22. Mundim AV, Morais IA, Tavares M, Cury MC, Mundim MJS. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by Hepatozoon sp. and with other hematozoa. A retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 2008;153:3-8.
23. Lasta CS, Santos AP, Mello FPS, Lacerda LA, Messick JB, Gonzáles FHD. Infecção por Hepatozoon canis em canino doméstico na região Sul do Brasil confirmada por técnicas moleculares. *Cienc Rural.* 2009;39:2135-40.
24. Paludo GR, Dell'Porto A, Trindade ARC, Mcmanus C, Friedmann H. Hepatozoon spp.: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. *Vet Parasitol.* 2003;118:243-8.
25. Aragão SKS, Meneses AMC, Figueiredo MJM, Lima MS, Vasconcelos MVN. Ocorrência de Hepatozoon canis em cão (relato de dois casos). In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 2004, Gramado. Gramado: Conbravet; 2004. p.35.
26. Salgado FP. Identificação de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul, Brasil [dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2006.
27. Baneth G, Samish M, Shkap V. Life cycle of Hepatozoon canis (Apicomplexa: adeleorina: Hepatozoidae) in the tick Rhipicephalus sanguineus and domestic dog (Canis familiaris). *J Parasitol.* 2007;93:283-99.
28. Baneth G, Samish M, Alekseev E, Arach I, Shkap V. Transmission of Hepatozoon canis to dogs naturally-fed or percutaneously-injected Rhipicephalus sanguineus ticks. *J Parasitol.* 2001;89:379-81.
29. Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. *Parasit Vectors.* 2010;26:1-11.
30. Szabó MPJ, Souza LGA, Olegário MMM, Ferreira FA, Albuquerque Pajuaba Neto A. Ticks (Acari: Ixodidae) on dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Transbound Emerg Dis.* 2010;57:72-4.
31. Labruna MB, Homem VSF, Heinemann MB, Ferreira Neto JS. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Uruará eastern Amazon, Brazil. *J Med Entomol.* 2000;37:774-9.
32. Labruna MB, Souza SLP, Guimarães JR, Pacheco RC, Pinter A, Gennari SM. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2001;53:553-6.

33. Labruna MB, Camargo LMA, Terrassini FA, Ferreira F, Schumaker TTS, Camargo EP. Ticks (Acari: Ixodidae) from the State of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Syst Appl Acarol.* 2005;10:17-32.
34. Rubini AS. Infecção experimental de *Amblyomma* spp. (Acari: Ixodidae) com *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) de cães naturalmente infectados [tese]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2009.
35. Burlini L, Teixeira KRS, Szabó MPJ, Famadas KM. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? *Exp Appl Acarol.* 2010;50: 361-74.
36. Franque MP, Santos HA, Silva GVO, Tajiri GY, Massard CL. Características biológicas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) a partir de infestação experimental em cão. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2007;16:238-42.
37. Murata T, Inoue M, Tateyama S, Taura Y, Nakama S. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. *J Vet Med Sci.* 1993;55:867-8.
38. Smith TG. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *J Parasitol.* 1993;82:565-85.
39. Paperna I, Lainson R. *Hepatozoon* cf. *terzii* (Sambon and Seligman, 1907) infection in the snake *Boa constrictor constrictor* from north Brazil: transmission to the mosquito *Culex quinquefasciatus* and the lizard *Tropidurus torquatus*. *Parasit Vectors.* 2004;11:175-8.
40. Baneth G, Shkap V. Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. *J Parasitol.* 2003;89:379-81.
41. Metzger B, Paduan KS, Rubini AS, Oliveira TG, Pereira C, O'Dwyer LH. The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa:Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. *Vet Parasitol.* 2008;152:28-33.
42. André MR, Adania CH, Teixeira RHF, Vargas GH, Falcade M, Sousa L, et al. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. *Vet Parasitol.* 2010;173:134-8.
43. Gabrielli S, Kumlien S, Calderini P, Brozzi A, Iori A, Cancrini G. The first report of *Hepatozoon canis* identified in *Vulpes vulpes* and ticks from Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010;10:855-9.
44. Johnson EM, Allen KE, Panciera RJ, Ewing SA, Little SE, Reichard MV. Field survey of rodents for *Hepatozoon* infections in an endemic focus of American canine hepatozoonosis. *Vet Parasitol.* 2007;150:27-32.
45. Mathew JS, Ewing SA, Panciera RJ, Woods JP. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* Vincent-Johnson et al., 1997 to dogs by the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* Koch. *Vet Parasitol.* 1998;80:1-14.

Recebido em: 26/08/11

Aceito em: 27/11/12

LEISHMANIOSE FELINA: REVISÃO DE LITERATURA

Gabriela Villa Pirajá^{1*}
Denise Theodoro da Silva¹
Luciana Cristina Baldini Peruca²
Maria Fernanda Alves³
Mirian dos Santos Paixão³
Simone Baldini Lucheis⁴
Wesley José dos Santos⁵
Lívia Maísa Guiraldi⁵

RESUMO

As leishmanioses representam um grande problema em saúde pública, sendo responsáveis por cerca de 60 mil óbitos e milhares de novos casos anualmente em todo o planeta, apresentando-se sob as formas mucocutânea, cutânea e visceral, sendo esta última, muitas vezes fatal. No Brasil são endêmicas nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, infectando diversos mamíferos, incluindo o gato doméstico, a partir picada da fêmea de mosquitos do gênero *Lutzomyia*, os quais apresentam grande adaptação ao meio urbano. Elucidar a epidemiologia da doença tem sido o objetivo de várias pesquisas, já que a mesma tem comportamentos variados, conforme características da área e população. Apesar de serem susceptíveis e ter contato direto com humanos, o papel dos felinos na epidemiologia das leishmanioses ainda não foi esclarecido, pois esses animais podem ser assintomáticos ou ter a doença associada às doenças que causam imunossupressão, além de apresentarem uma resistência natural. A forma cutânea é a mais relatada em felinos, que podem apresentar também, uveíte, linfadenopatia local ou generalizada êmese, diarreia, desidratação, estomatite e anorexia. O diagnóstico pode ser clínico, parasitológico, imunológico e molecular. O tratamento é descrito em poucos casos, com relatos clínicos que variam de completo sucesso até eutanásia. Apesar da existência de alguns estudos pesquisando a soroprevalência da infecção em populações de felinos residentes em áreas endêmicas, não está claro ainda se as baixas prevalências da infecção e da doença, em gatos provenientes de áreas endêmicas, são devidas as falhas na detecção de anticorpos ou ao fato dos gatos apresentarem resistência natural à leishmaniose.

Palavras-chave: felinos, leishmaniose, soroprevalência, tratamento.

LEISHMANIASIS IN CATS: REVIEW**ABSTRACT**

Leishmaniasis are a major public health problem, accounting for about 60 000 deaths and thousands of new cases every year around the world, performing in the forms mucocutaneous, cutaneous and visceral, the latter often fatal. In Brazil the North, Northeast, Midwest and

¹ Mestrandas no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária – Área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar - FMVZ- UNESP - Botucatu.

*Autor para correspondência: gabipirajá@gmail.com.

² Médica Veterinária autônoma.

³ Mestrandas no programa de pós-graduação em Doenças Tropicais - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

⁴ Pesquisadora científica da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA/SAA), Pólo Regional Centro-Oeste – Sede Bauru.

⁵ Graduandos em Biologia na Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita”- campus de Bauru.

Southeast are endemic, infecting various mammals, including domestic cats through the bite of female mosquitoes of the genus *Lutzomyia*, which presents great adaptation to the urban environment. Elucidate the epidemiology of the disease has been the aim of several studies because it has varied behaviors as characteristics of area and population. Although, cats are able to be infected and direct contact with humans, their role in the epidemiology of leishmaniasis is still unclear, since these animals may be asymptomatic or have a disease associated with others diseases which cause immunosuppression, in addition they may have a natural resistance. The cutaneous form is the most reported in cats and they can present uveitis, lymphadenopathy local or general, emesis, diarrhea, dehydration, stomatitis and anorexia. The diagnosis can be clinical, parasitological, immunological and molecular. The treatment is described in a few cases, with clinical reports ranging from complete success until euthanasia. Despite the existence of some studies investigating the prevalence of infection in populations of cats living in endemic areas, it is not clear if the low prevalence of infection and disease in cats from endemic areas, are due to failures in detecting antibodies or the fact of cats present natural resistance to leishmaniasis.

Keywords: feline, leishmaniasis, seroprevalence, treatment.

LEISHMANIOSIS FELINA: REVISIÓN DE LA LITERATURA

RESUMEN

La leishmaniosis es un problema importante de salud pública responsable por cerca de 60.000 muertos y miles de casos nuevos cada año en todo el mundo, actuando en la forma mucocutánea, cutánea y visceral, esta última a menudo fatal. En Brasil es endémica en el norte, noreste, centro-oeste y sureste, infectando a varios mamíferos, incluyendo gatos domésticos a través de la picadura de mosquitos hembras del género *Lutzomyia*, las cuales presentan gran adaptación al medio ambiente urbano. Dilucidar la epidemiología de la enfermedad ha sido objeto de varios estudios ya que esta enfermedad presenta comportamiento variado dependiendo de las características de la región y de la población. A pesar de ser susceptibles a la infección y a su estrecho contacto con el ser humano, el papel de los gatos en la epidemiología de la leishmaniosis todavía no está claro, ya que estos animales pueden ser asintomáticos o sufrir enfermedades asociadas que causan inmunosupresión, además de que pueden tener resistencia natural. La forma cutánea es la más reportada en los gatos, con signos que incluyen uveítis, linfadenopatía local o general, vómitos, diarrea, deshidratación, estomatitis y anorexia. El diagnóstico puede ser clínico, parasitológico, inmunológico y molecular. Existen reportes de tratamiento con resultados clínicos que van desde la remisión completa hasta la eutanasia. A pesar de la existencia de algunos estudios que investigaron la prevalencia de la infección en las poblaciones de gatos que viven en regiones endémicas, no está claro si la baja prevalencia de la infección y la enfermedad en los gatos en dichas regiones se debe a fallas en la detección de anticuerpos o al hecho de presentar resistencia natural.

Palabras clave: felino, leishmaniosis, seroprevalencia, tratamiento

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias de caráter zoonótico, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, dos quais 22 espécies são patogênicas para o homem. Dependendo da espécie do protozoário envolvido e da relação do parasita com seu hospedeiro, pode apresentar distintas formas clínicas, ou seja, mucocutânea, cutânea ou visceral (1).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2), a prevalência da enfermidade em todo o mundo é de aproximadamente 12 milhões de casos, com mortalidade anual em torno de 60

mil e que, cerca de 350 milhões de indivíduos estão expostos ao risco de adquirir a infecção. Anualmente estima-se que ocorram 1,5 a 2 milhões de novos casos de leishmaniose, contudo, mesmo sendo relatada em 98 países, dos quais 88 são considerados endêmicos, acredita-se que muitos casos sejam negligenciados. Apenas 600 mil são oficialmente declarados, pelo fato de ser uma doença de notificação obrigatória em apenas 33 países (1, 2).

A transmissão das leishmanioses se dá pela da picada de fêmeas infectadas de dípteros da sub-família *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos, a hematofagia é um hábito exclusivo das fêmeas, que necessitam de sangue para a maturação dos ovos; desta forma, enquanto se alimenta, a fêmea pode ingerir macrófagos infectados, transformando-se em formas promastigotas no trato digestório do flebótomo. Ao realizar o repasto sanguíneo em outro vertebrado, os flebotomos inoculam saliva juntamente com as promastigotas, que ao serem fagocitadas por macrófagos no tecido, perdem seu flagelo devido a acidez no interior do fagolisossomo, caracterizando a forma amastigota (3).

Segundo Colombo (4), o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, que é uma espécie prevalente nas zonas urbanas, tem sido responsável pela transmissão da Leishmaniose Visceral Americana (LVA), na área urbana dos municípios da região oeste do estado de São Paulo. Contudo, na região metropolitana de São Paulo, a sua presença não foi detectada. Este fenômeno leva a supor que, outras espécies de flebotomíneos, ou outros ectoparasitas de cães, como os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e as pulgas *Ctenocephalides felis felis* possam estar envolvidas na transmissão da LVA. Estudo realizado pelo autor, mostrou que em cães infectados por pulgas e carrapatos, em todos os seus estados evolutivos e havia material genético positivo para *Leishmania infantum chagasi*, tendo sido detectado nesses ectoparasitas positividade variando de 53,1% nas pulgas, e 77,7% nas ninfas, inclusive após a ecdise de ninfa para o estágio adulto, sugerindo a capacidade dos carrapatos em preservar os parasitas vivos (4).

Os reservatórios da doença incluem mamíferos domésticos e silvestres que possam infectar-se por *Leishmania* spp. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2), os animais hospedeiros podem ser distinguidos em hospedeiro primário, secundário ou acidental. Os mamíferos conhecidos como reservatórios primários da enfermidade pertencem a diferentes ordens, incluindo os primatas (humanos), o cão doméstico (*Canis familiaris*), Rodentia, Edentata e Marsupialia. Da mesma forma, infecções por *Leishmania* foram relatadas em numerosas outras espécies a partir das ordens acima mencionadas, bem como em outros, que podem, em alguns casos, atuar como reservatórios secundários ou simplesmente como hospedeiros acidentais sem afetar a epidemiologia da doença (4, 5).

A LVA é uma zoonose reemergente e um grave problema de saúde pública, pois está amplamente distribuída nos quatro continentes, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia e Oriente Médio, sul da Europa, norte da África, América do Sul e Central, sendo que 90% dos casos estão concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Afeganistão, Bangladesh e Brasil. No Novo Mundo, onde áreas endêmicas se estendem do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, o principal agente causador da LVA é a *Leishmania infantum chagasi*, sendo que cerca de 97% dos casos humanos descritos são procedentes do Brasil (6).

Inicialmente considerada uma doença rural, passou a ocorrer em áreas urbanas de pequeno e médio porte e, atualmente, ocorre em grandes centros urbanos, revelando o processo de periurbanização da doença (7). No Brasil, a LVA apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição, ocorrendo nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste onde apresenta um comportamento epidemiológico cíclico, com aumento no número de casos em períodos médios a cada cinco anos (8, 9). No Estado de São Paulo, a leishmaniose visceral canina foi notificada pela primeira vez, em 1998, no município de Araçatuba (10).

Até o momento não existem estudos sobre a estrutura populacional da *Leishmania infantum chagasi* no Novo Mundo, com um número razoável de cepas em diferentes regiões, ambientes, hospedeiros e reservatórios, portanto o estado taxonômico da *Leishmania infantum chagasi* no Novo Mundo, ainda não está claro (8).

A prevalência da LVC em cães em países como Espanha, França, Itália e Portugal foi estimada em 2,5 milhões de animais infectados. O número de cães infectados na América do Sul é também estimado com altas taxas de infecção relatadas em algumas áreas do Brasil. Em Cuiabá (MT), 468 cães domiciliados foram avaliados sorologicamente utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Destes, 16 animais foram sororreativos, com uma prevalência de 3,4% das amostras (11). Ainda no estado do Mato Grosso, na cidade de Poxoréu, avaliação soroepidemiológica realizada em 1.112 cães, pela técnica de RIFI, identificaram 7,8% de animais reagentes (12). Em Goiânia, no estado de Goiás, encontrou-se positividade de 9,34% (20/214) para Leishmaniose Visceral Canina (LVC), utilizando-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (13).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma zoonose de ampla distribuição e possui um espectro de manifestações clínicas que estão relacionadas à espécie de *Leishmania* envolvida. Frequentemente ocasionada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, possui uma incidência anual de um a 1,5 milhões de novos casos (2, 14). No Brasil há registro de transmissão da doença em todos os estados desde 2003. Em Barra Mansa – RJ, mesmo não sendo uma região considerada endêmica para LTA, inquérito sorológico realizado em cães e gatos, demonstrou um percentual elevado de cães sororreagentes (15). Em 2010 foram notificados 21.981 casos confirmados de LTA, dos quais 2428 foram procedentes da região Sudeste (16).

Estudos epidemiológicos efetuados em focos de LVC na Europa, revelaram que, cerca de metade dos cães parasitados não apresentavam sintomatologia, contudo apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* (17), indicando a existência de animais que, mesmo aparentemente saudáveis, atuavam potencialmente infectantes para o vetor (18). Diversas espécies já foram relatadas com a infecção, como a preguiça (*Choloepus hoffmanni* e *Choloepus didactylus*), roedores dos gêneros *Proechmys*, *Rhipidomys*, *Oryzomys*, *Akodon*, *Rattus* e marsupiais (*Didelphis*), considerados primariamente reservatórios de *Leishmania* spp. no contexto da Leishmaniose Tegumentar. Outras espécies parecem desempenhar papel secundário, como no caso dos equídeos, felídeos e canídeos, considerados hospedeiros acidentais, uma vez que não há evidências que comprovem o papel desses animais como reservatórios do parasita. Em estudo realizado por Aguilar, Rangel e Deone (19), no estado do Rio de Janeiro, em uma área endêmica para leishmaniose cutânea, foram examinados 26 animais, entre eles, cavalos e mulas, sendo que dez deles possuíam lesões ulceradas em várias partes do corpo. Por meio de esfregaços das marginais das lesões, obtidas através de biópsia, observaram 30,8 % de parasitismo para *Leishmania*.

Em Cuiabá (MT), foram analisados soros sanguíneos de 468 cães, dos quais, 16 foram reagentes à RIFI, obtendo-se uma prevalência geral de 3,4%. Os principais fatores de risco observados neste estudo foram a localização dos cães no peridomicílio, bem como a proximidade das residências nas matas, evidenciando mudanças na ocorrência da doença no ambiente urbano (11).

A prevalência da LVC em áreas endêmicas é consideravelmente maior do que a doença clínica aparente (20). Países da América do Sul, como Argentina e Paraguai, vem apresentando, de forma crescente, relatos da enfermidade em cães e em humanos, entretanto, o Brasil é responsável por 90% dos casos da América Latina (21). Além disso, a leishmaniose está emergindo dentro de áreas não endêmicas, principalmente por causa do transporte de cães de áreas endêmicas e as mudanças climáticas, favorecendo a expansão da distribuição geográfica do vetor flebotomíneo (22).

A adoção de gatos como animais de estimação tem crescido muito nos últimos anos, e por este motivo, estudos sobre as doenças que albergam os felinos, são importantes para a profilaxia das enfermidades. A proximidade com o homem e o fato de ser uma espécie susceptível à infecção por *Leishmania* spp. enuncia a hipótese da participação da espécie felina na epidemiologia das leishmanioses. Como afirmam Amato Neto e Pasternak (23) “... há muito para catalogar e investigar nos nossos problemas de saúde pública, até porque se não o fizermos, ninguém o fará e vamos continuar copiando normas de outros lugares...”, logo, há necessidade de constante atualização e revisão das prioridades, nos diferentes níveis, para a tomada de decisões nos sistemas de saúde, com necessidade de refinado acompanhamento e, na medida do possível, antecipar-se a essas possíveis tendências.

Tendo em vista a importância em saúde pública que as leishmanioses representam, acrescido ao fato de que os gatos estão se tornando mais populares como animais de companhia, o presente trabalho tem como objetivo realizar uma revisão da doença em felinos, a fim de se analisar a participação do gato na epidemiologia das leishmanioses.

EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses em gatos (*Felis catus*) tem sido relatadas esporadicamente em várias partes do mundo, mas seu papel como reservatório ainda não foi esclarecido completamente (1). A infecção natural de um gato doméstico por *Leishmania* spp. foi primariamente descrita em 1912, na Argélia, em um animal de quatro meses de idade, que convivia com um cão e uma criança, portadores de leishmaniose visceral. O diagnóstico baseou-se no achado de formas amastigotas do parasita em medula óssea, sem a identificação da espécie causadora de enfermidade (24). A partir de então, mais de 40 casos clínicos foram relatados na Europa, incluindo Portugal (25, 26), Itália, França (27), Espanha (28), Grécia e também, em países como Israel/Palestina, Egito, Suíça (29), Irã, Guiana Francesa, Venezuela e Brasil (30-33), países estes que apresentam áreas endêmicas para *Leishmania* spp. (1, 34).

Estudos na Itália e na Síria comprovaram, por meio da tipagem de DNA, parasitas idênticos no sangue dos felinos e no intestino dos flebotômíneos, que se infectaram naturalmente ao realizar repasto sanguíneo, comprovando a transmissibilidade do parasita. Esta evidência de transmissibilidade comprovada dos parasitas de felinos a um vetor sugere que os gatos podem exercer o papel de reservatórios domésticos da doença ao invés de simplesmente um hospedeiro acidental (1, 35, 36).

O gato doméstico pode ser infectado por diversas espécies de *Leishmania*, podendo ou não ser sintomático e apresentar sinais clínicos inespecíficos, que comumente incluem lesões nodulares ou ulceradas no focinho, lábios, orelhas e pálpebras e alopecia (30). Todavia, alguns autores referem que os gatos possuem certo grau de resistência natural à infecção por *Leishmania*, na ausência de outra doença ou estado de imunossupressão, por apresentarem os títulos de anticorpos muito baixos e sinais estereotipados, não característicos. Com efeito, os baixos títulos de anticorpos contra *Leishmania* spp. observados nos gatos têm sido geralmente atribuídos à capacidade destes animais para gerar anticorpos específicos contra um agente patogênico presente no seu meio, sem sofrer da doença (1, 36-38).

A doença em felinos geralmente está associada a outras enfermidades que causam imunossupressão, como a FIV (Vírus da Imunodeficiência Felina) e FeLV (Vírus da Leucemia Felina), embora muitos estudos têm apoiado a idéia de que eles possam de fato ser um reservatório de leishmaniose, demonstrando sorologia positiva mesmo na ausência de sinais clínicos atribuídos a enfermidade, infecção por *Toxoplasma gondii* e / ou outras doenças típicas dos felinos (1, 20, 30, 34). Vicente Sobrinho et al. (36), pesquisaram a co-infecção de *Leishmania* spp. com *Toxoplasma gondii*, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) em uma população de gatos de uma área endêmica para leishmaniose visceral. Concluíram que, os gatos que viviam em áreas endêmicas de

leishmaniose visceral eram significativamente mais propensos a serem co-infectados com o FIV, os quais poderiam apresentar sinais clínicos como, alterações de comportamento e, portanto, gatos em tais áreas devem ser sempre cuidadosamente selecionados para co-infecções.

De acordo com Bray (1982) apud Maia, Nunes e Campino (26), um bom reservatório deve estar em contato estreito com o homem, deve ser sensível ao agente patogênico e deve fazê-lo disponível para o vetor em quantidades suficientes para causar infecção e, esta deverá apresentar uma evolução crônica, permitindo que o animal sobreviva pelo menos até a próxima transmissão; assim, o fato dos gatos se infectarem pelo protozoário e não desenvolverem a doença, ao mesmo tempo em que podem portar o parasito no sangue periférico e co-habitarem com o homem, pode qualificar essa espécie animal como reservatório alternativo de *Leishmania infantum chagasi* e não apenas como hospedeiro acidental. Trabalho realizado em Portugal demonstrou que gatos infectados naturalmente não se recuperam sem terapia específica (36).

Os casos clínicos de leishmaniose felina (LF) já descritos, foram causados por diferentes espécies do agente incluindo: *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis* (30) e *Leishmania infantum chagasi*, embora a leishmaniose cutânea seja a forma mais frequentemente observada nesta espécie (9). Longoni et al. (1) realizaram uma pesquisa em 95 gatos de dois estados do México e verificaram a presença de anticorpos anti-*L. mexicana*, anti-*L. braziliensis* e anti-*L. panamensis*, utilizando as técnicas de ELISA e Western blot.

Maia, Nunes e Campino (26), pesquisando a leishmaniose em 138 felinos, na área metropolitana de Lisboa, Portugal, demonstraram que, de todos estes animais, em 28 (20,3%) foram detectados no sangue periférico a espécie *Leishmania infantum*, utilizando a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Com resultados diferentes da pesquisa anterior, no Oriente Médio, na região de Jerusalém, Nasereddin, Salant e Abdeen (39), encontraram soroprevalência em felinos por *L. infantum* de 6,7 %, utilizando a técnica de ELISA.

Na Espanha, o primeiro caso de LF foi referenciado em 1933 e desde então, casos clínicos esporádicos foram relatados. Estudos sorológicos realizados em diversas regiões da Espanha, demonstraram taxa de soroprevalência variando de 1,7 a 60 % em gatos (35). Em Madrid, área endêmica para LVC, estudos em felinos identificaram soroprevalência de 1,29% (3/233) pela RIFI, utilizando ponto de corte de 1/100. Relataram também que sete gatos foram sororreativos para *Leishmania infantum*, com diluição de corte de 1/50, resultando em 4,29% de sororreativos, sendo que, à técnica de PCR, apenas um animal (0,43%) apresentou positividade (40).

Na Grécia, o primeiro estudo de soroprevalência de *Leishmania* spp. em gatos foi realizado apenas em 2009 e apresentou baixa soroprevalência (3,87%), embora este país tenha-se caracterizado como altamente endêmico para leishmaniose humana e canina (41).

No Brasil, estudos em Andradina e Araçatuba, municípios do Estado de São Paulo, demonstraram soroprevalência felina variando entre 4,2 e 51,9% dos animais, respectivamente (42, 43).

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses rotineiramente é realizado principalmente pelos exames parasitológicos (identificação do parasita em esfregaço sanguíneo e/ou cultivo do parasita), imunológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e moleculares (Reação de Cadeia em Polimerase- PCR) (44).

A técnica mais utilizada na rotina para pesquisa de anticorpos anti- *Leishmania* é a Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI, que possui sensibilidade variável de 80% a 95%. Já os exames parasitológicos, baseados na demonstração de formas amastigostas do

parasita, tanto dentro do macrófago como na forma livre, permitem o diagnóstico definitivo da infecção. A citologia aspirativa é indicada nas lesões cutâneas (LTA), da mesma maneira para os linfonodos superficiais na LV. Em se tratando de LV, pode-se realizar punção dos linfonodos ou de medula óssea, sendo o material coletado corado com Giemsa, para a busca das formas amastigotas. O mesmo material coletado para a realização do exame direto pode ser utilizado em exames parasitológicos indiretos, como a inoculação em meios de cultura. Para o cultivo de *Leishmania* é fundamental utilizar meio bifásico, sendo vários deles empregados como fase líquida e o Novy-MacNeal-Nicolle – NNN ou ágar-sangue como fase semissólida. Em casos com resultados parasitológicos e sorológicos negativos ou inconclusivos, é possível realizar em laboratórios especializados no diagnóstico molecular, utilizando-se fragmentos de pele, mucosas, sangue periférico, medula óssea ou órgãos do sistema fagocítico-mononuclear (45). O teste parasitológico direto para diagnosticar LV com a demonstração do parasita em material de biópsia ou punção aspirativa de tecidos, como o de baço, pode ser mais sensível que de medula óssea (46).

LEISHMANIOSE FELINA NO BRASIL

O quadro clínico na leishmaniose felina é inespecífico e assemelha-se aos sinais clínicos apresentados pela espécie canina, dentre eles anorexia, emese, linfadenomegalia, dermatites, uveítes, alopecia difusa, emaciação, hipertermia e atrofia do músculo temporal.

Em cães, as lesões de pele granulomatosa ou piogranulomatosa aparecem como pápulas, nódulos e / ou placas. As lesões podem ser solitárias ou múltiplas, e localizada ou generalizada (47).

Serrano et al. (33), descreveram o primeiro caso de leishmaniose felina em Araçatuba-SP, área endêmica para leishmaniose visceral. Neste caso, o animal apresentava alopecia e descamação na região do ouvido e temporal, características de dermatite crostosa. Foram utilizados a RIFI e ELISA para verificar a presença de anticorpos anti- *Leishmania* spp., associado ao exame parasitológico e a técnica de PCR, confirmando a infecção.

Em outro estudo, realizado na cidade de Araçatuba, utilizando 200 gatos adultos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), a existência da infecção foi confirmada pela pesquisa direta do parasita em esfregaços obtidos por punção aspirativa de linfonodo, medula óssea, baço e fígado, assim como pela determinação de anticorpos anti- *L. chagasi*, no teste de ELISA indireto. Os resultados demonstraram uma prevalência de infecção em 14,5% (31/200), sendo 4% (8/200) por diagnóstico parasitológico e 11,5% (23/200) por sorologia. Dois gatos soropositivos apresentaram lesões de pele e hepatoesplenomegalia, contudo, não foi possível afirmar que tais alterações eram decorrentes da infecção por *Leishmania* spp., uma vez que não foram excluídas outras enfermidades infecciosas (48).

A partir de um caso canino de LTA, no município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, área considerada não endêmica, foi realizado um inquérito sorológico em 177 cães e 43 gatos, sendo detectados pela RIFI, 10,7% de cães sororreagentes e 5,6% de cães inconclusivos. Entre os felinos, nenhum foi reagente à RIFI, porém ao ELISA, 2,4% apresentaram sororeatividade e 4,8% apresentaram resultados indeterminados (49). Já Da Silva et al. (50), relataram em área endêmica do município do Rio de Janeiro soroprevalência elevada (25%) para *Leishmania* spp. em gatos domésticos assintomáticos.

No Distrito Federal, com o objetivo de verificar a ocorrência de *Leishmania* spp. em felinos domésticos procedentes de área endêmica para leishmaniose visceral humana e canina, foi realizada uma pesquisa utilizando 89 gatos domiciliados, os quais foram submetidos a exame clínico inicial e coleta de sangue, para a realização da PCR. Na PCR, foram identificadas 53 amostras de sangue positivas para *Leishmania* spp. (59,55%). Posteriormente, foram coletadas dez amostras de linfonodos, medula óssea e pele de animais positivos,

utilizados para o diagnóstico da *Leishmania* spp. por meio de técnicas moleculares (PCR e RFLP-PCR), parasitológicos, imunoistoquímico e imunocitoquímico e cultivo celular. Na PCR dos tecidos, 9/10 amostras de linfonodos e medula óssea, foram positivas e 8/10 fragmentos de pele, também foram positivos. Todas as amostras foram negativas, para as outras técnicas testadas. Não houve alterações hematológicas, bioquímicas e clínicas significativas quando comparados com os animais negativos (51).

Coelho et al. (52), em Andradina, no estado de São Paulo, avaliaram 52 gatos do município, com o objetivo de detectar espécies de *Leishmania*. Foram realizados os exames parasitológicos diretos, como *imprints* de linfonodo, medula óssea e baço e após avaliação das amostras positivas, as mesmas foram submetidas ao PCR e sequenciamento. A infecção foi detectada em 5,76% (3/52) dos gatos examinados. Em apenas dois animais foram identificados formas amastigotas da *Leishmania* spp. nos exames parasitológicos de linfonodos. Em outra pesquisa realizada no mesmo município, o estudo soroepidemiológico em 70 gatos com a finalidade de identificar a infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Leishmania* spp., detectou anticorpos anti-*T. gondii* em 15,7% (11/70) dos animais e em relação a *Neospora caninum*, nenhum animal foi positivo. Dados como raça, idade, alimentação e contato com animais de outras espécies foram significativos para considerar a positividade para *T. gondii* ($P \leq 0,0001$). Gatos que tinham acesso às ruas (17,1%, 11/64), que coabitavam com ratos (19,6%, 10/51) e que se alimentavam de comida caseira e leite cru (27,2%, 6/22) foram positivos para *T. gondii*. Além disso, 4,2% (3/70) dos gatos foram positivos para *Leishmania* spp. pela técnica de ELISA e negativos pela RIFI sem co-infecção com *T. gondii* e *Leishmania* spp. Não houve positividade contra o vírus da imunodeficiência felina ou vírus da leucemia felina nestes animais (42).

Souza et al. (49), relataram o segundo caso de LF, na qual *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* foi encontrada em um gato doméstico de Ribas do Rio Pardo, no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, verificando-se que os sinais clínicos eram semelhantes aos observados em outras doenças comumente diagnosticadas em gatos, como a criptococose e esporotricose.

Da Silva et al. (50), sugeriram que a resposta imune à infecção por *Leishmania* spp. em gatos diferia das observadas em cães, o que deve explicar o pequeno número de animais infectados e sintomáticos. Talvez a baixa quantidade de casos notificados seja devido aos inquéritos sorológicos em poucas áreas endêmicas e em se diferenciar clinicamente a LF de outras doenças comuns em gatos. Como consequência muitos animais só são diagnosticados, quando se tornam sintomáticos; contudo, devem ser realizados diagnósticos diferenciais para as lesões cutâneas (50). Dessa forma, a LF deve ser sistematicamente incluída no diagnóstico diferencial em gatos que apresentem lesões cutâneas sugestivas, realizando-se pesquisas sorológicas e histopatológicas apropriadas especialmente em áreas endêmicas de leishmaniose canina, uma vez que não há sinais patognômicos dessa enfermidade (50, 53).

Estudo realizado no Mato Grosso do Sul, avaliando-se o comportamento histopatológico de lesões características de leishmaniose cutânea em camundongos infectados experimentalmente, com *Leishmania amazonensis* isolada de um gato, demonstraram elevado grau de parasitismo cutâneo na pata, 20 dias após a infecção nos camundongos. Associado à infecção, observou-se infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, eosinofílico intenso e difuso, além de necrose moderada e difusa. Inflamação focal e perivascular foi observada no fígado, contudo não foram encontrados parasitas no mesmo (54).

TRATAMENTO

O tratamento da leishmaniose envolve uma combinação de antimônio e alopurinol, como a primeira opção no protocolo terapêutico. Embora estes fármacos promovam, na maioria dos casos, a recuperação clínica de animais, eles não produzem a eliminação completa do parasita (28). O tratamento da leishmaniose felina é descrito em poucos casos,

com resultados clínicos que variam de completo sucesso até eutanásia (55). Até o momento, o tratamento para a doença, tanto canina como felina, é contraindicado no Brasil, de acordo com a Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008, a qual proíbe o tratamento de cães com LV, por não existir até o momento uma garantia de que os fármacos existentes sejam eficazes ou que haja redução na transmissão da doença, ou ainda que o animal não se mantenha como reservatório, vetando em todo território nacional o tratamento da LV em cães infectados ou doentes com produtos de uso humano ou produtos não registrados no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (56).

Marcos et al. (55), na Espanha, relataram um caso clínico de um gato de 4 anos de idade, com leishmaniose visceral que, apesar do tratamento, apresentou piora clínica e foi submetido à eutanásia. Possivelmente, devido ao fato de que a leishmaniose felina continue a ser uma doença subdiagnosticada e mal esclarecida, não existem trabalhos suficientes na literatura, que indiquem todas as medidas para controlar a leishmaniose felina, enquanto a maioria de tratamentos clínicos empregados para gatos, siga protocolos de terapias usadas para cães (57).

A proteção dos animais por meio de inseticidas tópicos à base de deltametrina, com o objetivo de repelir flebotomíneos implicados na transmissão e vacinação, são medidas que tem mostrado efeitos adicionais no controle da leishmaniose visceral canina (58). Ainda que, em outubro de 2011, a comercialização e o uso de uma das vacinas contra LV canina tenha sido deferida pelo MAPA, este método ainda é controverso, uma vez que, até o momento, ainda não tenha sido comprovado, por meio do xenodiagnóstico, que cães vacinados não sejam transmissores da enfermidade aos vetores. Além disso, o Ministério da Saúde e a OMS não recomendam o uso da vacina em Saúde Pública ou como um método preventivo da LV (56, 59).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As leishmanioses são importantes em saúde pública, visto a adaptação do vetor ao meio urbano e ao estreito contato dos animais reservatórios com os humanos. Elucidar a epidemiologia da doença tem sido o objetivo de várias pesquisas em todo o mundo, já que a mesma tem comportamentos variados, conforme características da área e população.

O gato doméstico é um dos mamíferos susceptíveis à infecção por *Leishmania* spp. e, pelo fato de ser uma espécie crescente como *pet*, faz-se necessário identificar sua participação no ciclo epidemiológico das leishmanioses. Apesar de serem susceptíveis, os gatos parecem ter uma resistência natural e, geralmente, as leishmanioses em felinos estão associadas às doenças que causam imunossupressão. A forma cutânea é a mais relatada em felinos.

Estudos para prevalência sorológica indicam que os felinos podem ser infectados e apresentarem-se assintomáticos. Ainda que se realizem estudos pesquisando a soroprevalência da infecção em populações de felinos residentes em áreas endêmicas, não está claro se as baixas prevalências de infecção e de doença, em gatos provenientes de áreas endêmicas, sejam devidas a falhas na detecção de anticorpos ou ao fato dos gatos apresentarem resistência natural à leishmaniose.

REFERÊNCIAS

1. Longoni SS, López-Cespedes A, Sánchez-Moreno M, Bolio-Gonzalez ME, Sauri-Arceo CH, Rodríguez-Vivas RL, et al.. Detection of different *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2012;35(5):469-76.

2. World Health Organization. Leishmaniasis [Internet]. Geneva: WHO; 2012 [cited 2012 Jul 09]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
3. Gushi LT. Estrutura populacional de *Lutzomyia longipalpis* através da amplificação e sequenciamento do segmento ribossomal 12s de DNA mitocondrial [dissertação]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2008.
4. Colombo FA. Detecção de RNA de *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi em pulgas e carrapatos coletados de cães naturalmente infectados e padronização de uma PCR em tempo real para o diagnóstico e diferenciação de espécies de leishmania [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2012.
5. Oliveira-Pereira YN, Morales JLP, Lorosa ES, Rebelo JMM. Feeding preference of sand flies in the Amazon, Maranhão State, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2008;24(9):2183-6.
6. Brazil RP, Pontes MCQ, Passos WL, Fuzari AA, Brazil BG. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the region of Saquarema: potential area of visceral leishmaniasis transmission in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(1):120-1.
7. Missawa NA, Veloso MAE, Maciel GBML, Michaelisky EM, Dias ES. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(1):76-8.
8. Elkhoury ANSM. Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. In: Organizacion Panamericana de la Salud. Informe Final de Reunion de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas [Internet]. Rio de Janeiro: Panaftosa; 2005. p.24-6 [acesso em 2012 Jul 09]. Disponível em: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=16960&Itemid=
9. Kulhs SK, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, et al. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1155.
10. Luvizotto MCR, Biazzono L, Eugênio FR, Andrade AL. 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.
11. Almeida ABPF, Faria RP, Pimentel MFA, Dahroug MAA, Turbino NCMR, Souza VFR. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(2):156-9.
12. Azevedo MA, Dias AKK, Paula HB, Perri SHV, Nunes CM. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo, Estado do Mato Grosso, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2008;17(3):123-7.

13. Azevedo EMR, Duarte SC, Da Costa HX, Alves CEF, Silveira Neto OJ, Jayme VS, et al. Estudo da Leishmaniose Visceral Canina no município de Goiânia, Goiás, Brasil. *Rev Patol Trop*. 2011;40(2):159-68.
14. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases [Internet]. Geneva: WHO; 2010 [cited 2012 Jul 10]. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf
15. Figueiredo FB, Bonna ICF, Nascimento LD, Costa T, Baptista C, Pacheco TMV, et al. Avaliação sorológica para a detecção do anticorpo anti-Leishmania em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;(42):141-5.
16. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral das Doenças Transmissíveis. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Casos de Leishmaniose tegumentar americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2010 [Internet]. Brasília: MS/SVS; 2011 [acesso em 2012 Ago 01]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf
17. Gradoni L, Pozio E, Bettini S, Gramiccia M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). (III) The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980;74(3):421-2.
18. Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, Gonzalez F, Castillo JA, et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Plebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994;88(4):491-3.
19. Aguilar CM, Rangel EF, Deane LM. Cutaneous Leishmaniasis is frequent in equines from na endemic área in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986;81(4):471-2.
20. Baneth G, Koutinas A, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*. 2008;24(7):324-30.
21. Acardi SA, Liotta DJ, Santini MS, Romagosa CM, Salomón OD. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(6):796-9.
22. Palatnik de Sousa CB, Day MJ. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2011;4(1):197.
23. Amato Neto V, Pasternak J. Pesquisas: prioridades para a nossa saúde pública. *Rev Saude Publica*. 2008;42(5):972-3.
24. Sergeant E, Lombaard J, Quilichini M. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la meme habitation. *Bull Soc Pathol Exotique*. 1912;5:93-8.

25. Costa Durão JF, Rebelo E, Peleteiro MC, Correia JJ, Simões G. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Conselho de Sesimbra). Nota preliminar. *Rev Port Cienc Vet.* 1994;89(511):140-4.
26. Maia C, Nunes M, Campino L. Importance of cat in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008;8(4):555-9.
27. Pratlong F, Rioux JA, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dereure J, Lanotte G, et al. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J Clin Microbiol.* 2004;42(9):4077-82.
28. Solano-Galego L, Rodríguez-Cortéz A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada Y, et al. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(4):676-80.
29. Rufenacht S, Sager H, Muller N, Schaerer V, Heier A, Welle MM, et al. Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland. *Vet Rec.* 2005;156(17):542-5.
30. Mello GB. Verificação da infecção natural do gato (*Felis domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. *Bras Med.* 1940;54(12):180.
31. Rossi CN. Ocorrência de *Leishmania* sp em gatos do município de Araçatuba-São Paulo [dissertação]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2007.
32. Silva AVM, Candido CDS, Pereira DP, Brasil RP, Carreira JCA. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* 2008;105(1):92-4.
33. Serrano ACM, Nunes CM, Savani ESM, Nicoletti SR, Bonello DFL, Vasconcelos RO, et al. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba - SP - relato de caso. *Clin Vet.* 2008;(76):36-40.
34. Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol.* 2007;145(3-4):267-73.
35. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2007; 145(3-4):357-60.
36. Vicente Sobrinho LS, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AA, Lima VM, et al. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2012;187(1-2):302-6.
37. Mancianti F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia.* 2004;46(1-2):203-6.

38. Vita S, Aguzzi I, Petrotta E, Luciani A. Feline leishmaniasis and erlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Vet Res Commun*. 2005;29(2):319-21.
39. Nasereddin A, Salant H, Abdeen Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. *Vet Parasitol* .2008;158(4):158-9.
40. Ayllon T, Tesouro MA, Amusatogui I, Rodriguez-Franco F, Sainz A. Serologic and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* in Cats from Central Spain. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1149:361-4.
41. Diakou A, Papadopoulos E, Lazarides K. Specific anti-*Leishmania* spp antibodies in stray cats in Greece. *J Feline Med Surg*. 2009;11(8):728-30.
42. Coelho WMD, Amarante AFT, Apolinário JC, Coelho NMD, Lima VMF, Perriand SHV, et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. *Parasitol Res*. 2011;109(4):1009-13.
43. Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LSV, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, et al. *Leishmania chagasi* in cats with dermatologic lesions from an endemic area of Visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*. 2011;178(1-2):22-8.
44. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2007.
45. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual para recomendações de diagnósticos, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania* - HIV. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
46. Melo NM. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. In: Anais do 13º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & Anais do 1º Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses; 2004, Ouro Preto. Ouro Preto: SBPV; 2004. p.41-5.
47. Santero D, Prisco M, Ciaramella P. Cutaneous Steril granulomas/piogranulomas, leishmaniasis and mycobacterial infections. *J Small Anim Pract*. 2008;49(11):552-61.
48. Costa TAC, Rossi CN, Laurenti MD, Gomes AAD, Vides JP, Vicente Sobrinho LS. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2010;47(3):213-7.
49. Souza AL, Nunes VLB, Borralho VM, Ishkawa EAY. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Pardo, Mato Grosso do Sul State, Brazil : A case report . *J Venom Anim Toxins Trop Dis*. 2009;15(2):359-65.
50. Da Silva AV, De Souza Cândido CD, De Pita Pereira D, Brazil RP, Carreira JC. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop*. 2008;105(1):92-4.
51. Marodin NB. Estudo da avaliação laboratorial e ocorrência da infecção pela *Leishmania* spp. nos felinos domésticos de uma região periurbana Distrito Federal [dissertação].

- Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2011.
52. Coelho WM, Richini-Pereira VB, Langoni H, Bresciani KD. Molecular detection of *Leishmania* sp em cats (*Felis catus*) from Andradina municipality, São Paulo state, Brazil. *Vet Parasitol.* 2012;176(2-3):281-2.
 53. Grevot A, Jaussaud HP, Marty P, Pratlong F, Ozon C, Hass P, et al. Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and Felv positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite.* 2005;12(3):271-5.
 54. Duarte IRM, Arruda CCPD, Andrade ARO, Nunes VLB, Souza AID, Dourado DM, et al. Comportamento biológico de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* isolados de um gato doméstico (*Felis catus*) do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Patol Trop.* 2010;39(1):33-40.
 55. Marcos R, Santos M, Malhão F, Pereira R, Fernandes AC, Montenegro L, et al. Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. *Vet Clin Pathol.* 2009;38(2):201-5.
 56. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial n.1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [Internet]. Belo Horizonte; 2008 [acesso em 2013 Mar 11]. Disponível em: <http://www.crmvmg.org.br/novoportal/Conteudo/detalheConteudo.aspx?id=158>
 57. Simões-Mattos L, Teixeira MJ, Costa DC, Prata Jr JRC, Bevilaqua CML, Sidrim JJC, et al. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Vet Parasitol.* 2002;103(3):207-16.
 58. Palatnik de Souza CB, Silva Antunes I, Morgado ADE, Menz I, Palatnik M, Lavor C. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas. *Vaccine.* 2009;27(27):3505-12.
 59. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Nota de esclarecimento sobre tratamento da Leishmaniose [Internet]. Brasília; 2013 [acesso em 2013 Jan 18]. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/portal/destaque.php?cod=1105>

Recebido em: 07/09/12

Aceito em: 10/12/12

A GENÔMICA BOVINA - ORIGEM E EVOLUÇÃO DE TAURINOS E ZEBUINOSWilham Jorge¹**RESUMO**

As duas formas de gado, identificadas como taurinos e zebuínos, são basicamente diferenciadas entre si pela ausência e presença de cupim ou giba. Os fetos com poucas semanas já possuem o cupim. Os bovinos são hoje representados por cerca de 800 raças, numa população mundial de 1,4 bilhões de animais. Destas, cerca de 480 são taurinos e estão na Europa. No Brasil são cerca de 60 raças, o que representa 7,5% do total. Os trabalhos sobre o seqüenciamento e análise do genoma bovino publicados na Science em 2009, realizado em taurinos, zebuínos e seus cruzamentos, representam o esforço de um Consorcio de três centenas de pesquisadores de 25 países. Os resultados são capazes de identificar a variabilidade genética que afetam a produção de leite e carne, a reprodução, a resistência à doenças, bem como um guia para a seleção individual nos programas de cruzamentos. Os estudos recentes do DNA mitocondrial de fósseis e de animais viventes indicam que populações do extinto auroque (*Bos primigenius*) foram os progenitores do gado europeu (*Bos taurus taurus*) e do gado zebu (*Bos taurus indicus*). Daí a proposta de denominação das duas subespécies de bovinos: *Bos primigenius taurus* para os taurinos e *Bos primigenius indicus* para os zebuínos. Evidências arqueológicas mostraram que taurinos e zebuínos surgiram independentemente em pelo menos dois locais de domesticação entre 10.000 a 8.000 anos atrás provenientes de distintos grupos de auroque. Os taurinos emergiram do Oriente Próximo (Crescente Fértil) e os zebuínos do Vale do rio Indo (hoje Paquistão) com difusão pela Índia e mais recentemente (3.000 anos) com a introdução de machos no norte da África. Dados moleculares sugerem que o gado zebu do norte da África originou-se do cruzamento de linhagens primitivas locais de taurinos utilizando a introgressão com machos zebuínos. Posteriormente, o gado acompanhou a migração humana pela Ásia, África, Europa e Américas, levando a dispersão e cruzamentos de taurinos e zebuínos. O genoma dos bovinos contem, ao menos, 22.000 genes e o tempo estimado de divergência indica que *taurus* e *indicus* se separaram há 1,7 a 2,0 milhões de anos atrás com sequência de nucleotídeos 16.338 e 16.339 respectivamente, diferindo entre si em 237 posições.

Palavras-chave: origem, evolução, taurinos, zebuínos.

THE BOVINE GENOMIC - ORIGIN AND EVOLUTION OF TAURINE AND ZEBUINE CATTLE**ABSTRACT**

The two forms of livestock, identified as taurine and zebu, are basically differentiated from each other by the absence and presence of hump. Fetuses with a few weeks already have hump. Cattle are now represented by about 800 races, a world population of 1.4 billion animals. Around 480 are in Europe and are taurines. In Brazil, about 60 races, which accounts for 7.5% of the total. Work on the sequencing and analysis of the bovine genome published in Science in 2009, held in taurine, zebu cattle and their crosses, represent the effort of a Consortium of three hundred researchers from 25 countries. The results are able to identify the genetic variability affecting the production of milk and meat, reproduction, disease

¹ Professor de Genética aposentado da UFMG (Departamento de Biologia Geral) e UNESP (Departamento de Genética) wjorge2@gmail.com. Telefone 14 3882 0925.
Correspondência: Caixa Postal 079 18.603-970 - Botucatu, SP.

resistance, as well as a guide for individual selection in breeding programs. Recent studies of mitochondrial DNA from fossils and living animals indicate that populations of the extinct aurochs (*Bos primigenius*) were the progenitors of European cattle (*Bos taurus taurus*) and zebu cattle (*Bos taurus indicus*). Hence the proposed designation of two subspecies of cattle, *Bos primigenius taurus* for taurines and *Bos primigenius indicus* for zebu. Archaeological evidence showed that taurine and zebu cattle have arisen independently in at least two places of domestication between 10,000 to 8,000 years ago from different groups of aurochs. Taurines have emerged from the Near East (Fertile Crescent) and zebu from Indus Valley (now Pakistan) with diffusion by India and more recently (3000 years) with the introduction of males in North Africa. Molecular data suggest that zebu cattle in North Africa originated from the crossing of local primitive lineage of taurines using the male zebu introgression. Subsequently, cattle accompanied human migration throughout Asia, Africa, Europe and the Americas, leading to dispersion and crosses of taurine and zebu cattle. The cattle genome contains at least 22,000 genes and the estimated time of divergence indicates that taurus and indicus split from 1.7 to 2.0 million years ago with 16,338 nucleotide sequence and 16,339 respectively, differing among themselves in 237 positions .

Keywords: origin, evolution, taurine, zebuine cattle

LA GENOMICA BOVINA - ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE TAURINOS Y CEBUINOS

RESUMEN

Las dos formas de ganado, identificadas como taurinos y cebuinos, son básicamente diferenciadas entre sí por la ausencia y presencia de giba. Los fetos con pocas semanas ya poseen giba. Los bovinos son actualmente representados por cerca de 800 razas, en una población mundial de mil cuatrocientos millones de animales. De estas, cerca de 480 son taurinos y se encuentran en Europa. En Brasil hay alrededor de 60 razas, lo que representa 7,5% del total. Los trabajos sobre el secuenciamiento y análisis del genoma bovino publicados en la revista Science en 2009, realizado en taurinos, cebuinos y sus cruza, representan el esfuerzo de una sociedad de tres centenas de investigadores de 25 países. Los resultados son capaces de identificar la variabilidad genética que afectan la producción de leche y carne, la reproducción y la resistencia a enfermedades, siendo también usados como guía para la selección individual en los programas de cruzamiento. Los estudios recientes del ADN mitocondrial de fósiles y de animales vivientes indican que poblaciones del extinto uro (*Bos primigenius*) fueron los progenitores del ganado europeo (*Bos taurus taurus*) y del ganado cebú (*Bos taurus indicus*). Por ello se considera la propuesta de denominación de las dos subespecies de bovinos: *Bos primigenius taurus* para los taurinos y *Bos primigenius indicus* para los cebuinos. Evidencias arqueológicas muestran que taurinos y cebuinos surgieron independientemente en por lo menos dos sitios de domesticación entre 10.000 y 8.000 años atrás, provenientes de distintos grupos de uros. Los taurinos surgieron del Oriente Próximo (Creciente Fértil) y los cebuinos del Valle del río Indo (hoy Pakistán) y se difundieron por la India y más recientemente (3.000 años), con la introducción de machos, en el norte de África. Datos moleculares sugieren que el ganado cebú del norte de África se originó del cruzamiento de linajes primitivas locales de taurinos utilizando la introgresión con machos cebuinos. Posteriormente, el ganado acompañó la migración humana a través de Asia, África, Europa y América, lo que promovió la dispersión y cruzamientos de taurinos y cebuinos.

El genoma de los bovinos contiene, por lo menos, 22.000 genes y el tiempo estimado de divergencia indica que taurus e indicus se separaron hace 1,7 a 2,0 millones de años, con

secuencia de nucleótidos 16.338 y 16.339 respectivamente, que difieren entre si en 237 posiciones.

Palabras clave: origen, evolución, taurinos, cebuinos.

INTRODUÇÃO

Genômica é o estudo completo do genoma de um organismo. Esta ciência reúne todos os métodos para analisar o DNA incluindo os marcadores moleculares, o sequenciamento, os microarrays, o mapeamento de genes, a bioinformática e as análises da expressão dos genes. Genoma é a sequência completa do DNA, contendo toda a informação genética de um organismo. O genoma bovino está contido em 29 pares de autossomos mais os cromossomos sexuais, X ou Y. Os gametas (células haplóides) possuem uma cópia do genoma, enquanto as células somáticas (diplóides) possuem duas.

Toda a informação genética para a formação de um novo organismo está contida em código, na sequência de bases que compõem a molécula de DNA. Ela contém a informação genética que controla as funções vitais do organismo. Todas as características morfológicas de etiologia genética são determinadas por genes que são sequências específicas de bases nitrogenadas.

Dada a estrutura das quatro diferentes bases, uma base A (adenina) sempre se liga a uma T (timina) e uma C (citosina) sempre se liga a uma G (guanina). Assim, a sequência de nucleotídeos A-C-T-G em uma cadeia permite deduzir que a cadeia complementar é T-G-A-C. O código genético é o código por meio do qual a informação genética contida na sequência de três bases (códon) especifica um dos 20 aminoácidos da proteína. O RNA é também composto por nucleotídeos. As diferenças com o DNA é que no RNA o açúcar é a ribose e não a desoxirribose e a base timina é substituída pela uracila. O DNA é formado pela dupla hélice e o RNA é encontrado principalmente como uma cadeia simples de nucleotídeos. Um dos três tipos de RNA, o RNA mensageiro (mRNA) é aquele que copia a mensagem de um gene do DNA e a transporta até o citoplasma. Os outros RNAs são: o RNA ribossômico (rRNA) e o RNA transportador (tRNA). Uma mensagem presente no DNA é transcrita para o mRNA. A mensagem do mRNA é lida resultando na formação de uma proteína (tradução) com função celular específica.

A informação genética dos bovinos está organizada em dois tipos de genoma: genoma nuclear que contém cerca de 99% do DNA da célula. O restante 1% é composto pelo genoma mitocondrial localizado nas mitocôndrias ou DNA mitocondrial (abreviadamente DNAm). O DNA das mitocôndrias é transmitido por herança materna, passando de uma geração a outra, pelo citoplasma do ovócito. Dessa forma, o DNAm de um indivíduo é inteiramente derivado da sua mãe. A variação na sequência de nucleotídeos do DNAm tem sido a base para a maioria dos estudos sobre a origem e evolução de taurinos e zebuínos.

Por meio da sequência de nucleotídeos do DNA nuclear e do DNAm podem ser analisadas questões relacionadas com a extensão da divergência molecular entre taurinos e zebuínos, a filogenia, suas origens no processo evolutivo, os locais e centros de domesticação, migração, expansão, etc.

A biologia molecular aplicada à bovinocultura teve seu início com o advento dos marcadores de aloenzimas nas décadas de 60 e 70. A partir daí tem auxiliado no aumento da produção da cadeia produtiva da carne e do leite por meio de avaliações genéticas que levam aos acasalamentos direcionados para um melhor desempenho dos animais.

Nos últimos 10.000 anos a criação de gado tem sustentado os seres humanos em suas necessidades de alimentação com carne e leite, de agasalho com couro e pele e como animais de transporte e companhia. No último século, a origem e evolução dos bovinos tem sido tema para os pesquisadores e mais recentemente é assunto predominante para geneticistas e

arqueologistas. Nas duas últimas décadas, os estudos de filogenética molecular permitiram comparar a diversidade genética dentro e entre as raças levando à construção das filogenias moleculares, história das raças e de suas origens.

Uma das descobertas mais importantes do século XX foi a de que as moléculas evoluem da mesma forma que as estruturas macroscópicas. Quanto mais próximo o parentesco entre dois organismos, mais semelhantes são as suas moléculas. Quando as evidências morfológicas são ambíguas, as semelhanças das moléculas podem revelar o grau de parentesco entre as espécies. A estrutura das moléculas sofrem mudanças da mesma forma que as estruturas macroscópicas. A maioria das moléculas sofrem mutações constantes ao longo do tempo e podem servir como um “relógio molecular” definido como a “regularidade observada nas mudanças de uma molécula, semelhante a um relógio, ao longo do tempo geológico”(1). O relógio molecular foi utilizado, por exemplo para demonstrar que a bifurcação entre o homem e o chimpanzé aconteceu entre cinco e oito milhões de anos e não entre 14 e 16 milhões de anos como se pensava antes.

Elsik et al. (2) mostraram que o genoma bovino possui aproximadamente 3 bilhões de unidades de informação ou pares de bases do DNA e pelo menos 22 mil genes. Especificamente estes resultados são capazes de identificar as variações genéticas que afetam a produção e representam também um guia para seleção individual nos programas de cruzamentos.

Com base nas informações do genoma, o processo de seleção pode ser mais preciso, com descarte de animais inferiores e otimização do melhoramento genético. Com ele será possível dispor antecipadamente de informações sobre as características individuais de produtividade e na identificação de portadores de doenças genéticas recessivas.

O genoma mitocondrial das duas formas de gado, taurinos e zebuínos, contem 16.338 e 16.339 nucleotídeos respectivamente, e diferem em 237 posições. O tempo estimado de divergência indicam que os dois táxons se separaram há 1,7 a 2,0 milhões de anos atrás (3).

Os taurinos e zebuínos compreendem a maior parte do gado do mundo, entretanto a sua origem, classificação sistemática e domesticação ainda geram controvérsia: o próprio Lineu os considerou como duas espécies separadas, designando-as *Bos taurus* e *Bos indicus*, animais sem e com cupim, respectivamente. A classificação de Lineu e seus seguidores deu ênfase à morfologia do crânio e o comprimento e morfologia dos chifres.

Os estudos recentes de DNAm de fósseis e de animais viventes indicam que populações do extinto auroque (*Bos primigenius*) foram os progenitores do gado europeu (*Bos taurus*) e do gado zebu (*Bos indicus*), daí a proposta de uma nova denominação para as duas subespécies: *Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius indicus*, para taurinos e zebuínos, respectivamente (3).

Nesta revisão, os enfoques são os cromossomos e a genômica bovina, com os recentes avanços na pesquisa, visando o entendimento sobre a origem e o processo evolutivo de taurinos e zebuínos.

AS TÉCNICAS PARA ANÁLISE DO DNA GENÔMICO DE BOVINOS FÓSSEIS E VIVENTES

Para estudar a história genética dos bovinos bem como a análise filogenética e demográfica, inúmeras pesquisas foram realizadas nas duas últimas décadas.

Os novos conhecimentos sobre a análise de marcadores moleculares nucleares, mitocondriais e do cromossomo Y, utilizando DNA de fósseis e de raças atuais, tem causado um grande impacto nos recentes avanços sobre a origem, a domesticação e a história evolucionária dos bovinos.

Para a extração de material antigo (período Neolítico, 10 mil anos) o DNAm foi extraído de fragmentos de ossos bem preservados, provenientes de museus de História

Natural, sítios arqueológicos, escavações, cavernas, etc. utilizando técnicas específicas de extração para DNAm. Os extratos de DNA foram preparados por técnicas de amplificação por PCR e análise do sequenciamento de nucleotídeos. Este DNA apresenta três propriedades que lhe causam dano: contaminação, fragmentação e degradação, tornando-o mais difícil de analisar quando comparado com amostras recém coletadas de animais vivos.

A análise do genoma bovino de animais vivos foram e tem sido realizadas pela extração do DNA nuclear proveniente de amostras de sangue fresco (leucócitos), sêmen, bulbos de pelos, fibroblastos e biópsias de tecidos. O DNAm foi isolado e o D Loops amplificado utilizando a reação de PCR com “primers” construídos. Para analisar a variação na sequência de nucleotídeos utilizam-se DNA citoplasmático das mitocôndrias, DNA genômico do núcleo e DNA microssatélite do cromossomo Y.

Uma ampla bibliografia com detalhes dessas metodologias estão disponíveis nas referências: (4-13).

Detalhes técnicos para a análise de DNA genômico autossomal e de haplótipos de cromossomo Y de animais vivos, podem ser obtidos nas referências: 3, 10-23.

DNA CITOPLASMÁTICO DAS MITOCÔNDRIAS – DNAm D LOOP - MARCADORES MITOCONDRIAIS

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas que possuem os seus próprios cromossomos e são relacionadas com a produção da energia da célula. Marcadores mitocondriais são variações normais na sequência de nucleotídeos, espalhadas no genoma, chamadas polimorfismos. A variação na sequência de nucleotídeos do DNAm tem sido a base para estudos sobre a origem e evolução de taurinos e zebuínos.

As variações mais comuns entre os indivíduos são os SNPs que são diferenças na sequência de DNA envolvendo somente um par de bases nas quais a variação encontrada envolve uma única base de DNA.

No DNAm existe uma região não-codificadora, denominada D-Loop, que é muito variável, sendo importante na identificação de indivíduos e espécies e na caracterização de raças. O genoma mitocondrial é, em grande parte, idêntico entre os indivíduos, com exceção da região D-Loop de aproximadamente 1.100 pares de bases. Apresenta grandes diferenças entre as espécies animais devido a sua alta taxa de mutação.

Machos e fêmeas herdam os seus DNAm de suas mães, que os herdam das avós maternas, bisavós maternas etc. Os machos não transmitem suas mitocôndrias para as suas proles pois os espermatozoides só possuem algumas moléculas de DNAm que não entram no ovócito. Assim, o DNAm de um indivíduo é todo derivado da sua mãe (Figura 1).

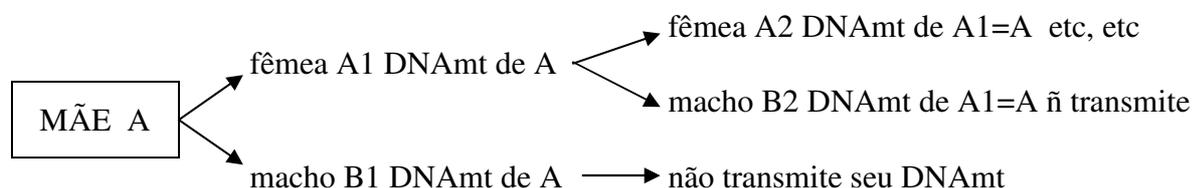


Figura 1. A mãe A transmitiu o seu DNAm para sua filha A1 e o seu filho B1. Este não transmite o seu DNAm e encerra a sua carreira em termos de transmissão de DNAm. A filha A1 transmite o seu DNAm para a sua filha A2 e para o seu filho B2. O DNAm de A2 e B2 é o mesmo da sua avó, ou seja, da mãe A. A transmissão foi portanto: fêmea A > fêmea A1 > fêmea A2.

A taxa de mutação do DNAm é cerca de 10 vezes maior que no DNA nuclear o que o torna ideal para a diferenciação de espécies e estudos de evolução.

A análise do DNAm_t de taurinos e zebuínos permitiu identificar 237 polimorfismos e estimar o tempo de divergência entre taurus e indicus em 1,7 a 2,0 milhões de anos (3). A sequência completa do DNAm_t da raça Brahman foi analisada mostrando que haplótipos taurinos de gado de corte europeu estavam presentes em 90% do genoma desta raça (17).

MARCADORES MICROSSATÉLITES OU STR

O microsatélite é um tipo de DNA nuclear. São sequências de 2 a 8 nucleotídeos repetidos em “tandem”, também chamados de STR (Short (Simple) Tandem Repeats) distribuídos ao longo do genoma nuclear. O DNA satélite possui composição diferente de bases, apresenta densidade própria, permitindo purificá-lo por centrifugação. Recebe esse nome por formar “satélites” em relação ao DNA genômico. A denominação mini e microsatélite está relacionada com o número de pares de bases. Os minissatélites são sequências com maior número de bases que os microsatélites. Um exemplo são os telômeros dos cromossomos que possuem minissatélites formados por sequências “em tandem” de 6 bases (TTAGGG)_n, repetidas “em seguida” n vezes.

São utilizados na caracterização das raças, na análise da diversidade entre e dentro das raças, do nível de endogamia, da introgressão, etc. Por meio dos microsatélites foi possível analisar e entender a grande bifurcação entre as origens distintas de taurinos e zebuínos.

Os STRs são excelentes marcadores genéticos por causa do grande polimorfismo e a sua abundante distribuição em todo genoma. Ihara et al. (11) utilizaram 3802 microsatélites e 3960 marcadores para a construção do mapa genético de alta densidade dos bovinos.

MARCADORES SNPS OU POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA

São diferenças na sequência de DNA envolvendo somente um par de bases. SNPs (pronuncia-se snips). São as variações mais comuns entre os indivíduos nas quais a diferença encontrada envolve uma única base de DNA. Até hoje existem cerca de 1.800.000 SNPs no genoma bovino. São menos polimórficos que os microsatélites porém mais frequentes. Marcadores SNPs de cromossomo Y foram utilizados por Bollongino et al. (13) que verificaram que não houve hibridação entre machos auroque da Europa e o gado doméstico.

HAPLÓTIPOS DE CROMOSSOMO Y OU MARCADORES MICROSSATÉLITES DO CROMOSSOMO Y

Marcadores microsatélites do Y são de grande interesse porque são haplóides e de herança paterna. A falta de recombinação do Y em 95% da sua extensão implica na sua herança em bloco como um haplótipo. O cromossomo Y é um dos menores do cariótipo bovino (2 a 3% do cariótipo). A variabilidade observada no Y (polimorfismos do Y) é decorrente unicamente de mutações na linhagem germinativa sendo, portanto, menos diversificada. Os marcadores genéticos, específicos de Y, tem sido utilizados para identificar e acompanhar o fluxo de genes entre populações mediados por machos nos bovinos. Liu, Beattie e Ponce de Leon (18) identificaram nos bovinos 46 marcadores microsatélites na região não-recombinante (inclusive o SRY) e 13 genes na PAR.

Estudos de DNA antigo de bovinos por meio de haplótipos de Y são mais raros porque o Y é exclusivo dos machos. Além disso, a preservação do DNA nuclear é mais difícil do que o DNAm_t (13).

Sondas Y-específicas permitiram a discriminação entre taurinos e zebuínos (19). A utilização de marcadores micros satélites localizados no Y que apresentam alelos de zebus, permitiu verificar a introgressão mediada por machos no gado africano (15, 20, 21) o que foi observado também na formação de raças japonesas, coreanas e mongólicas (22).

Götherström et al. (23) identificaram três tipos de haplótipos de Y: Y1 e Y2 de várias raças taurinas européias e Y3 dos zebuínos. Esses últimos originaram-se de eventos de domesticação separados dos taurinos, no que se refere ao tempo e a área geográfica. Na formação do haplótipo Y1 houve introgressão de machos selvagens com o gado domesticado.

MICROARRANJOS, CHIPE DE DNA, CHIPE BIOLÓGICO OU DNA MICROARRAY

De acordo com Farah (24), a tecnologia de microarranjos de DNA é talvez a mais poderosa para a análise dos ácidos nucleicos. Permite uma investigação completa e simultânea dos genomas, permitindo estabelecer a relação funcional entre todos os genes presentes no genoma. Esta metodologia tem impulsionado o estudo das funções gênicas (genômica funcional) em diferentes organismos, incluindo caracteres normais ou patológicos. O termo microarranjo é uma tradução do termo microarray pelo qual esta técnica é mais conhecida. São utilizados na detecção e quantificação de ácidos nucleicos (mRNA na forma de cDNA ou DNA genômico). Aqui o DNA genômico é fixado em um filtro e hibridizado com uma sonda que reconhece o gene ou uma região do gene. Cada gene ou região do gene em estudo utiliza uma hibridação em separado com sondas específicas. Como cada sonda ocupa uma posição definida e conhecida no filtro, o conjunto de sondas, dessa forma distribuídas, forma um "array" que significa arranjo, ordem. Um microarray bovino foi desenvolvido por Wiggans et al. (25) (Illumina BovineSNP BeadChip) contendo aproximadamente 57.000 SNPs para associações com características de importância econômica nos bovinos.

COMBINAÇÃO DE MARCADORES NUCLEARES E MITOCONDRIAIS

Hassanin e Douzery (26) descrevem uma metodologia em que dois marcadores mitocondriais e dois nucleares foram combinados e submetidos a análise filogenética na família Bovidae.

O TEMPO GEOLÓGICO, OS BOVINOS E SEUS ANCESTRAIS

O tempo geológico compreende as várias transformações ocorridas na paisagem terrestre, de forma gradual. Representa a linha do tempo desde a formação da terra até o presente. A ordem cronológica dos períodos geológicos tem como base o princípio da superposição das rochas isto é rochas mais jovens estão depositadas sobre as mais antigas. No campo as rochas são datadas pela análise dos fósseis.

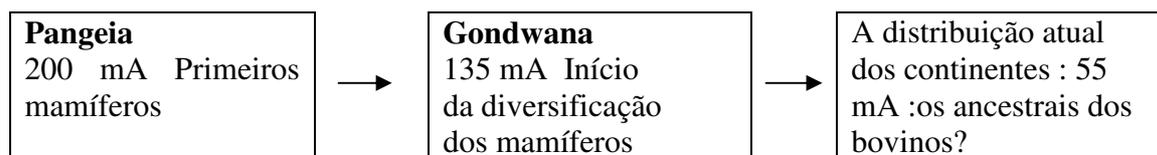
Com base na idade dos registros fósseis, o tempo geológico é dividido em eons, eras, períodos, épocas e idades, medidos em bilhões, milhões ou milhares de anos e com diferentes durações. Não há concordância entre os pesquisadores quanto aos nomes e limites das divisões.

Os estratos ou camadas podem se referir a períodos geológicos ou a estágios (épocas) dentro dos períodos com base no seu conteúdo de fósseis (27).

O intervalo mais longo e antigo do tempo geológico é o Pré-Cambriano com 4.560 milhões de anos, representando a maior parte da história da terra. O mais recente é o Eon Fanerozóico (vida abundante) que corresponde aos tempos modernos. O Fanerozóico está dividido em três Eras: Paleozóico (vida antiga), Mesozóico (vida média) e Cenozóico (vida recente). Estas Eras estão subdivididas em Períodos e estes em Épocas (Tabela 1).

Tabela 1. Escala do tempo geológico da Sociedade Americana de Geologia de 1999 modificado de Benton (29) mostrando as divisões do tempo geológico e suas datações atualmente aceitas. A versão de 2009, completa e detalhada pode ser vista em Geosociety.org/science/timescale. (MiA = milhões de anos)

Eon	Era	Período	Época	Data do começo (MiA)
Fanerozóico	Cenozóica	Quaternário	Holoceno	0,01
			Pleistoceno	1,8
		Terciário	Plioceno	5
			Mioceno	24
			Oligoceno	34
			Eoceno	55
			Paleoceno	65
	Mesozoica	Cretáceo		144
		Jurássico		200
		Triássico		251
	Paleozóica	Permiano		290
		Carbonífero		354
		Devoniano		417
		Siluriano		443
		Ordoviciano		495
		Cambriano		545
Precambriano				4560



Na Era Mesozóica do Tempo geológico há cerca de 250 milhões de anos, os continentes estavam agregados em uma única massa continental, a Pangeia, circundada por um único oceano, o Pan Thalassa. Foi no início da Era Mesozóica que surgiram os primeiros dinossauros e os primeiros mamíferos (27) e provavelmente os ancestrais dos bovinos. Foi nesta Era (há 135 milhões de anos) que ocorreu o fenômeno denominado Deriva continental (28) que é o deslocamento ou movimento dos continentes e oceanos, uns em relação aos outros, por efeito da tectônica de placas continentais.

Com a fragmentação da Pangeia, formaram-se dois continentes, um ao norte com a América do Norte e a Eurásia (Laurásia) o outro ao sul a Gondwana formada pela África e América do Sul. No fim do Cretáceo e ainda no Mesozóico há 65 ma, a Laurásia rompeu-se no sentido norte/sul dando origem a América do Norte e a Eurásia. Neste período ocorreram a diversificação dos dinossauros e dos primeiros mamíferos com o surgimento dos ancestrais dos bovinos.

A Gondwana começa então a se fragmentar em África, América do Sul, Austrália, Índia e Antártica até ser como é hoje com os continentes amplamente separados (27). Após a separação, ocorre a grande diversificação dos mamíferos. O exemplo clássico é a fauna dos mamíferos endêmicos da Austrália e Nova Zelândia ser composta apenas de marsupiais.

A ORIGEM DOS ARTIODÁCTILOS, UM ENIGMA?

O mais antigo ancestral fóssil dos bovinos, o artiodáctilo *Diacodexis*, um pequeno animal de membros compridos e menor do que um coelho, foi considerado como o mais primitivo Artiodactyla conhecido. Aparece em estratos do início do Eoceno (55 ma) na América do Norte, Europa e Ásia, bem após a Deriva continental da América do Sul e África. Aparece também em estratos na Índia e no Paquistão na mesma Época. A descoberta do *Diacodexis* na Índia e no Paquistão (*Diacodexis paquistanensis*) levanta a dúvida deste último ser mais primitivo que a forma existente na América do Norte e Eurásia. Com isso, a origem geográfica da Ordem Artiodactyla, permanece sem solução (28).

Não é sempre que são encontrados os registros fósseis. Com a ausência de formas intermediárias, a origem da Ordem Artiodactyla é ainda um enigma, diferentemente do *Equus caballus* em que todos os elos foram encontrados. No caso dos artiodáctilos, o aparecimento súbito do *Diacodexis*, sem registro de ancestrais é um mistério na trajetória evolutiva dos bovinos, permanecendo até hoje a questão: como e onde originaram-se os artiodáctilos? (28)

A ORIGEM DOS RUMINANTES

Todo o processo de diferenciação dos bovinos surgiu a partir deste artiodáctilo basal que sobreviveu até o Oligoceno (34 ma) na América do Norte, Europa e Ásia. No Oligoceno (34 ma) surgem os artiodáctilos Selenodontes cujo principal grupo é constituído pelos Ruminantes que são os bois, antílopes, cervos e cervos-camundongos (29). O *Hypertragulus*, uma das primeiras formas de Ruminantes, um animal do tamanho de um coelho, surgiu no Eoceno / Oligoceno.

Hoje os ruminantes constituem um grupo de mamíferos com 192 espécies distribuídas em todo mundo com exceção da Austrália e Antártica (30). Na classificação atual dos bovinos (a seguir), a subOrdem Ruminantia está subdividida nas InfraOrdens Tragulina e Pecora. Tragulina é representado por uma única família vivente: Tragulidae (com três gêneros de trágulos ou cervos-camundongo (mouse-deer). Na InfraOrdem Pecora, além da família Bovidae (boi, carneiro e antílope), outras quatro famílias viventes são atualmente reconhecidas como pertencentes a esta Infra Ordem: Cervidae (cervídeos), Antilocapridae (*Antilocapra americana*), Giraffidae (girafas e ocapis da África) e Moschidae (musk deer ou “boi” almiscarado da Ásia).

Os representantes da família Bovidae são encontrados em todos os continentes exceto na América do Sul, Austrália e Antártica. Nos registros fósseis, esta família é facilmente identificada pela presença de chifres. Na tribo Bovini, além do gênero *Bos* estão também outros gêneros: *Bison* (bisão); *Bubalus* (búfalos); *Syncerus* (búfalo africano). Segundo alguns autores, a Anoa ou búfalo anão, pertence a uma única espécie do gênero *Anoa*.

A classificação da tribo Bovini é ainda contraditória. Alguns colocam como pertencentes a essa tribo, o iaque (*Phoepagus grunniens*), o banteng, kolprey, gaur e gaial (gênero *Bibos*).

Ordem Artiodactila
SubOrdem Ruminantia
InfraOrdem Pecora
Família Bovidae
Tribo Bovini
Gênero Bos

A análise morfológica e genética indicam que os cetáceos e os artiodáctilos tem um ancestral comum (31). Esta intrigante descoberta coloca os bovinos mais aparentados da baleia, do boto e do golfinho, do que do cavalo.

A ORIGEM DOS BOVINOS

A origem dos bovinos deixou os arqueologistas perplexos durante quase todo século XX quando existiram várias teorias controversas. Um dos pontos de maior discussão foi a de que os bovinos teriam uma única origem (teoria monofilética) ou várias origens (teoria polifilética) (32).

A **teoria polifilética** abrange várias hipóteses confluentes em duas grandes tendências, a difilética e a polifilética propriamente dita.

A difilética defende que os bovinos domésticos descenderam paralelamente de duas formas pré-históricas: o uro europeu (*Bos taurus primigenius*) de chifres longos e o uro de chifres curtos (*Bos taurus brachycherus*).

A polifilética propriamente dita, defende a evolução da espécie a partir de várias formas primitivas, que diferiam entre si pela estatura, peso, local de domesticação, dimorfismo sexual e pelas exuberantes diferenças entre os chifres (tamanho, morfologia e direção). Essas formas primitivas são as seguintes: *Bos taurus primigenius*; *Bos t. brachycherus* (de chifres curtos); *Bos t. frontosus* (considerado também como o resultado do cruzamento entre *B. t. primigenius* e *B. t. brachycherus*); *Bos t. aqueratus* (considerado como a forma sem chifre), *Bos t. brachycephalus* (de chifres curtos); *Bos t. orthoceros* e *Bos t. hamiticus*. Para os defensores da teoria polifilética, a domesticação teria acontecido simultaneamente em vários lugares, a partir de formas locais.

A TEORIA MONOFILÉTICA: AUROQUE, O ANCESTRAL DOS BOVINOS

A teoria monofilética baseia-se em um único ancestral, o Auroque ou uru (*Bos primigenius*). Antes de ser extinto em 1627, o auroque foi difundido em toda a Europa, norte da África e sul da Ásia. O auroque é aceito como o ancestral silvestre ou o precursor de todo o gado doméstico tanto taurinos como zebuínos e cuja domesticação começou há 10 mil anos e foi, do ponto de vista econômico, a mais importante espécie domesticada.

Auroque traduzido do alemão significa boi primitivo ou proto-boi, estando representado em cenas de caçadas nas pinturas rupestres existentes em rochas de cavernas do Pleistoceno (Idade da Pedra Lascada 2,5 mA). Descrito por Julius Cesar “como um animal um pouco menor que um elefante e com aparência, pelagem e forma de um boi”.

Possivelmente os auroques da Eurásia e do norte da África teriam variações nos fenótipos tais como cor da pelagem e forma do chifre, o que poderia indicar a existência de outras subespécies além daquelas já documentadas. Os atuais padrões de pelagem dos bovinos teriam surgido a partir da forma dominante escura do auroque, por mutação genética e seleção.

O auroque era um animal possivelmente agressivo, de grande porte, de cor negra ou castanha escura, pesando até 1.000 kg e medindo de 1,80 a 2,00 e 1,50 a 1,70 metros de altura, para machos e fêmeas, respectivamente (33). Cabeça grande, pescoço forte, perfil

retilíneo, fronte plana e pernas longas. Chifres grossos com mais de um metro de comprimento saindo lateralmente em linha reta para depois se dirigirem para frente e em seguida para cima (Figura 2).

O dimorfismo sexual no Auroque é evidente com as fêmeas pesando e medindo bem menos que os machos. Observa-se também que o gado doméstico atual é significativamente menor do que o seu progenitor selvagem.



Figura 2. *Bos primigenius primigenius* ou Auroque, considerado o ancestral do gado doméstico, extinto no século 17. Museu de História Natural de Nova York <http://www.prehistory.com/bosprimi.htm>

A sua vasta distribuição geográfica, do Atlântico ao Pacífico, foi documentada por meio dos seus fósseis localizados em toda a Eurásia e norte da África e em locais tão distantes como as Ilhas Britânicas e a China, o que deve ter propiciado a formação de três subespécies ou raças geográficas denominadas: *Bos primigenius primigenius* do norte da Eurásia, *B. p. opisthonomus* do norte da África e *B. p. nanadicus* do sul da Ásia (34).

As espécies de auroque africanas e da Ásia foram extintas há cerca de 2.000 anos porém a espécie da Europa Central sobreviveu até 1627 (34). Na Europa o auroque alcançou a maior densidade populacional no começo do Holoceno (0,01mA). As razões do seu declínio foram as caçadas, a perda de habitats e a competição com o gado doméstico o que resultou na sua não-sobrevivência. Acredita-se que o auroque foi extinto no Egito no começo do século XIV porém sobreviveu mais tempo em outras regiões inclusive na Europa: a última fêmea foi abatida em 1627 numa reserva florestal, próxima a Varsóvia na Polônia. Lamentavelmente o uru não pode ser visto em nossas Exposições, entretanto o seu genoma mitocondrial sobrevive no nosso gado.

A análise do DNA do *Bos primigenius* da Europa mostrou que as sequências são filogeneticamente mais próximas dos atuais taurinos do que dos zebuínos. A similaridade entre o *B. primigenius* e o *Bos taurus* sugerem que poderiam ser membros de uma única espécie (35). Segundo MacHugh et al. (20), a subespécie de auroque *Bos primigenius nanadicus*, do sul da Ásia, seria o mais provável ancestral dos zebuínos.

AS SUBESPÉCIES DE AUROQUE

Epstein e Mason (34) reconhecem ao menos três subespécies de auroque que são diferenciadas pelo tamanho do corpo e a forma do chifre em: *B. p. primigenius* do norte da Eurásia, *B. p. opisthomonus* do norte da África e *B. p. namadicus* do sul da Ásia. Esta última é, provavelmente, a progenitora do gado zebu domesticado. Bailley et al. (35) relatam que a sequência do DNAm do *Bos primigenius* das cavernas da Inglaterra é filogeneticamente mais

próxima dos atuais taurinos, a ponto de os considerarem como membros de uma mesma espécie.

A taxonomia das raças ou variedades de auroque é bastante controversa. Com base na análise do crânio, Grigson (36) propõe que *B. p. nanadicus* e *B. p. primigenius* sejam classificadas como espécies separadas. Segundo Felius, Koolmees e Theunissen (37) do *Bos primigenius* existem apenas duas subespécies: o *B. p. primigenius* que deu origem ao gado europeu sem cupim (*Bos taurus*) e o *B. p. nanadicus*, das regiões tropicais que deu origem ao gado de cupim (*Bos indicus*)

A DOMESTICAÇÃO DE TAURINOS E ZEBUINOS

A domesticação é definida como “o processo pelo qual ocorre um aumento da dependência mútua entre a sociedade humana e as populações de animais e plantas” (2).

A domesticação dos bovinos e sua capacidade de transformar capim em carne, leite e pele, tendo a celulose como fonte de energia, foi acompanhada de substanciais mudanças na história da humanidade no Período Neolítico, com modificações na dieta, no comportamento e na estrutura sócio-econômica das populações humanas (9).

Durante os séculos XIX e XX, após o processo de domesticação, as principais forças evolucionárias como mutação, seleção natural, migração, adaptação, deriva genética etc desenvolveram uma grande diversidade das populações de bovinos, o que culminou com a formação de novas raças para os mais diferentes propósitos, definindo-se como “animais da mesma raça” aqueles que, por meio de cruzamentos e seleção, adquiriram semelhanças entre si passando-as uniformemente para a descendência.

Nas últimas décadas os programas de seleção aceleraram o melhoramento genético com o emprego dos marcadores moleculares para a seleção fenotípica bem como a utilização da inseminação artificial, transferência de embriões e fertilização *in vitro*.

Os bovinos são hoje representados por cerca de 800 raças (2) e (35), algumas em perigo de extinção. Das 800 raças de bovinos hoje existentes, cerca de 480 estão na Europa, todas do tipo taurino (9). No Brasil existem cerca de 60 raças, o que representa 7,5% do total.

Os arqueologistas foram os primeiros a tentar reconstruir, por meio de caracteres morfológicos, a origem e a história evolutiva dos bovinos. Várias hipóteses contraditórias foram propostas, entre elas a de que os bovinos emergiram de vários centros de domesticação localizados em diferentes partes da Europa e da Ásia.

As evidências arqueológicas e a análise do DNAm_t mostram que a domesticação do auroque aconteceu independentemente em dois diferentes locais, entre 10.000 e 8.000 anos atrás. É universalmente aceito, com base nas evidências e estudos citados, que o gado moderno emergiu a partir do extinto auroque (*Bos primigenius*), em pelo menos dois eventos separados de domesticação a partir de duas subespécies de auroque no final do Pleistoceno e começo do Holoceno. Um dos eventos deu origem aos taurinos e aconteceu no Oriente Próximo ou Sudoeste da Ásia hoje representados por Anatólia (região asiática da Turquia), Síria, Líbano, Jordânia, Chipre, Israel, Iraque e Palestina, entre o mar Mediterrâneo e o Irã.

O outro evento ocorreu no Baluquistão (hoje Paquistão), dando origem aos zebuínos.

Com base na sequência de DNAm_t de raças taurinas européias, zebuínas indianas e taurinas e zebuínas africanas Troy et al. (38) e Loftus et al. (39) sugerem que todas as raças européias e africanas pertencem a uma linhagem e as indianas a uma outra. A aplicação do relógio molecular sugere que os dois clados principais de DNAm_t divergiram há, ao menos 200.000 anos e no máximo 1 milhão de anos. A grande divergência é interpretada como dois eventos de domesticação separados, proposição apoiada por Loftus et al. (40), provavelmente de duas diferentes subespécies de *Bos primigenius*.

Conforme Bradley et al. (41), o gado doméstico moderno revela que eles são derivados de progenitores taurinos, zebuínos ou resultante do cruzamento entre esses dois. Por outro

lado, a magnitude da divergência entre *taurus* e *indicus* indicam uma pré-domesticação em separado e que os taurinos da Europa e da África sofreram influência genética de duas linhagens separadas de auroque.

Loftus et al. (42) utilizando marcadores microsatélites de oito populações de bovinos do Oriente Próximo, da Europa, do Oeste da África e da Índia, demonstram que taurinos e zebuínos tiveram origens separadas e que o Oriente Próximo foi o centro de domesticação do gado taurino. O trabalho também demonstra fortes evidências da introgressão do zebu no gado do Oriente Próximo, com cruzamentos e seleção e possivelmente uma adaptação para as mudanças climáticas da região.

De acordo com Troy et al. (38), todas as raças europeias inclusive as britânicas, tiveram a sua origem no Oriente Próximo ou mais especificamente na sua área mais ocidental, o denominado Crescente Fértil que teria sido o centro de origem dos taurinos posteriormente expandido para a Europa. O outro evento teria ocorrido no Subcontinente indiano, no Vale do Rio Indo, dando origem aos zebuínos. A análise genética do DNAm_t revelou uma notável diferença entre os dois haplótipos. Esses autores examinaram a variação na sequência de DNAm_t de 392 bovinos da Europa, África e Oriente Próximo e compararam com dados de quatro bovinos selvagens extintos da Inglaterra. Identificaram quatro diferentes haplótipos de *Bos taurus*. Um desses haplótipos predominou na Europa e é um dos três encontrados com grande frequência no Oriente Próximo o que evidencia a origem do gado taurino europeu. Por outro lado, o gado africano mostrou pertencer a um haplogrupo separado que raramente é encontrado em outros locais.

Cymbron et al. (43) supõe que no continente europeu, a migração tenha ocorrido a partir do Oriente, seguindo dois caminhos principais: a Rota do Danúbio, expandindo-se pelas planícies do norte e do centro da Europa e a Rota ao longo da costa do Mediterrâneo.

De acordo com Götherström et al. (23) com base nos dados de DNAm_t e haplótipos do cromossomo Y, a domesticação do gado no Oriente Próximo foi seguida de hibridização com machos auroques na Europa, o que deixou um “imprinting” paterno na composição genética das raças modernas do norte e centro da Europa.

BOS PRIMIGENIUS TAURUS E B. PRIMIGENIUS INDICUS: UMA NOVA CLASSIFICAÇÃO?

Segundo Heindleder, Lewalski e Jenke (3), o tempo estimado de divergência entre *taurus* e *indicus* é de 1,7 a 2,0 milhões de anos atrás. A análise completa da sequência de nucleotídeos do DNAm_t foi de 16.338 e 16.339 nucleotídeos para taurinos e zebuínos, respectivamente. O número de pares de bases do auroque (*Bos primigenius*) é o mesmo do de taurinos (4). A análise realizada por Heindleder revelou que as duas subespécies diferem entre si em 237 posições. A análise filogenética “combinada” de taurinos e zebuínos vivos e do auroque, levou os autores a sugerirem uma nova denominação para as duas formas de gado domesticado: *B. primigenius taurus* para taurinos e *B. primigenius indicus*, para zebuínos, como “status” de duas subespécies de bovinos.

Beja-Pereira et al. (9) com base na sequência de DNAm_t de auroques italianos relatam que os seus dados são compatíveis com vários eventos de domesticação local na Europa e a favor da hipótese da origem múltipla do gado europeu. Algumas raças domesticadas do Oriente Próximo teriam sido introduzidas na Europa e provavelmente inter cruzadas com raças silvestres locais e também com o gado africano introduzido, formando uma importante fonte de recursos genéticos. Entretanto as sequências de SNPs de cromossomo Y não indicam hibridização entre o auroque europeu e o gado doméstico (13).

Negrini, Nijman e Milanesi (44) utilizando resultados de AFLP, enfatizando a divergência entre raças taurinas europeias, indicando uma grande influência do gado Oriente nas raças italianas e húngaras.

A ORIGEM E DOMESTICAÇÃO DOS ZEBUINOS

A domesticação dos zebuínos, segundo os estudos, teria ocorrido no Vale do Rio Indo (hoje Paquistão) com difusão pela Índia e só mais recentemente (há menos de 3.000 anos) teria sido introduzido na África pelos machos.

Como já foi assinalado, a análise do DNAm^t tem demonstrado que taurinos e zebuínos e taurinos europeus e africanos tiveram domesticações independentes. Os auroques do sul da Europa aparentemente foram os que mais contribuíram na domesticação dos bovinos.

O evento de domesticação que deu origem aos zebuínos ocorreu no Sul da Ásia conhecido como Subcontinente indiano (hoje representado pela Índia, Paquistão, Bangladesh, Nepal, Butão, Maldivas e Sri Lanka). Provavelmente o Vale do Rio Indo, localizado nesta região, foi o centro de domesticação dos zebuínos na mesma época dos taurinos (4). Entretanto a domesticação dos zebuínos aconteceu também no norte da África e na Europa, atestada pelos esqueletos e pinturas das cavernas do Paleolítico.

A partir da utilização de dados moleculares várias raças bovinas da Ásia e da África começaram a ser analisadas, com o intuito de descobrir os progenitores do gado zebuíno. Todas as raças asiáticas e africanas foram consideradas como zebuínos *Bos indicus*, com exceção da N'Dama, morfologicamente considerada como *Bos taurus*, existente em alguns países do Oeste da África como Gâmbia, Guiné, Guiné-Bissau, Nigéria e Senegal.

Segundo alguns autores a população de zebu desenvolveu-se independentemente em grupo separado no Neolítico (8 a 10 mil anos) no Baluquistão (hoje Paquistão). A subespécie de Auroque do sul da Ásia (*Bos primigenius nanadicus*) seria a mais provável progenitora desse gado (39).

Outras evidências arqueológicas e genéticas sugerem que os zebuínos são resultantes de um evento de domesticação do auroque (*Bos primigenius*) no sudoeste asiático. Entretanto uma domesticação independente pode ter ocorrido no norte da África e no leste da Ásia com possibilidade de introgressão local com o auroque silvestre. Embora as evidências arqueológicas apontam com segurança que a domesticação do zebu tenha sido no subcontinente indiano, a origem geográfica exata e a história filogenética do zebu permanecem incertas (45). Estes pesquisadores, analisando o DNAm^t, identificaram dois diferentes haplogrupos (I1 e I2) no Subcontinente indiano (1) consistente com a hipótese de que todo gado zebu teve origem nesta região. Para o haplogrupo I1 foi sugerido que o Vale do rio Indo (Indus Valley) que é uma sub-região do Subcontinente indiano (2). Este local teria sido o mais provável centro de domesticação dos zebuínos indicado também pelas evidências arqueológicas. Outros apóiam que a subespécie *Bos primigenius nanadicus* habitou o sul da Ásia dando origem aos zebuínos (36).

A CLASSIFICAÇÃO GENÉTICA DOS BOVINOS DA ÁFRICA

A origem do gado africano moderno é ainda controversa. No presente elas representam um mosaico de morfologias bovinas com o zebu e com predomínio de formas intermediárias referidas como "sangas". Os sangas são uma mistura de gado taurino da África sem cupim e de chifres compridos com o gado zebu introduzido na África nos últimos milênios, provenientes da Ásia.

Os exemplos vivos de que o gado africano é um taurino na sua origem são as raças do Oeste da África como a N'Dama da Guiné que não teve qualquer influencia do gado zebu e tem o seu DNAm^t exclusivamente de *Bos taurus*. As representações pictóricas da África mostram animais sem giba e os esqueletos encontrados não tem evidências de animais zebuínos. O gado com cupim são os migrantes mais recentes pois só estiveram presentes na África nos últimos milênios por meio de machos (36). De acordo com Anderung et al. (46),

inicialmente o gado africano domesticado era do tipo taurino. Hoje o gado africano é do tipo taurino, zebuino e de seus cruzamentos. Foram identificados haplótipos de origem taurina e zebuina, tanto no cromossomo X como no Y.

As raças bovinas africanas com cupim são classificadas como zebuínos, entretanto devem ser diferenciados dois tipos: com giba torácica, típica dos nossos zebuínos e classificadas como zebu e com giba cérvico-torácica classificadas como sangas. Os sangas envolvem uma mistura do gado original africano sem giba e chifres longos com o gado zebu com giba torácica ou cérvico-torácica de origem asiática (47).

A partir da utilização de dados moleculares as raças bovinas da África e da Ásia foram analisadas, com o intuito de descobrir os progenitores do gado moderno. Todas as raças asiáticas e africanas foram consideradas como zebuínos *Bos indicus*, com exceção da raça N'Dama do Oeste da África (Gâmbia, Guiné, Guiné-Bissau, Nigéria e Senegal) morfologicamente considerada como *Bos taurus*, juntamente com as européias e britânicas e cujos descendentes sobreviveram graças às adaptações para a resistência a doenças como a tripanosomíase e sofreram uma domesticação independente (44). Nas populações de Gâmbia, a raça N'Dama tem haplótipos de DNAm taurino e cromossomos Y zebuino (100%). Nas populações de Guiné Bissau há um polimorfismo de Y (19, 41).

A utilização de sondas Y específicas (lócus DYZ1) evidenciou a introgressão mediadas por machos zebuínos nas populações de N'Dama ocorrida há três mil anos (19). Essa introgressão nas populações de gado africano também foram observadas na formação de raças japonesas, coreanas e da Mongólia (22).

Nas últimas décadas, com a utilização de dados cromossômicos e moleculares uma nova classificação dos bovinos africanos foi sugerida por Frisch et al. (47) (Figura 3), considerando que quase nunca há uma concordância entre o tipo morfológico (com ou sem cupim) e os resultados dos marcadores de DNA (DNAm taurino ou zebuino) e cromossômicos (Y submetacêntrico ou acrocêntrico).

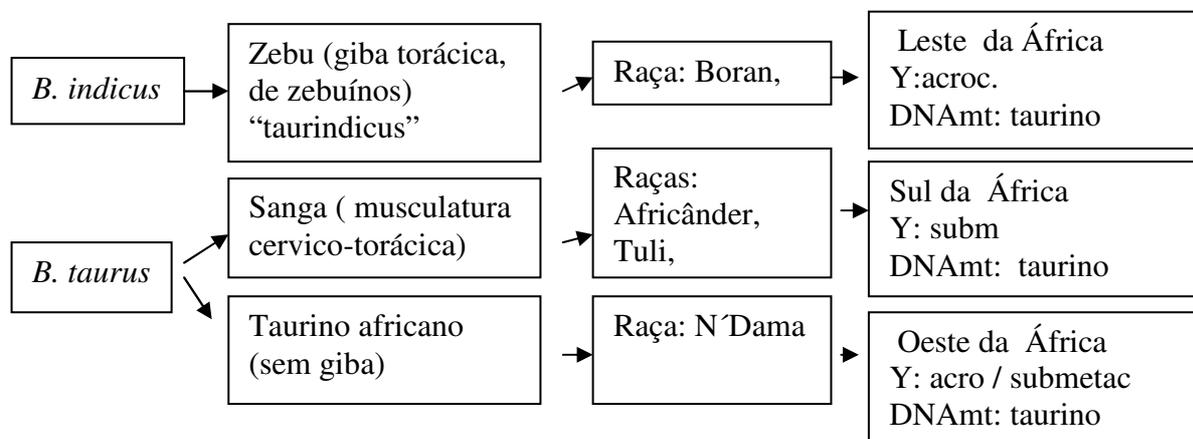


Figura 3. Classificação dos bovinos africanos modificado (47).

Nesta nova classificação, as raças do sul da África como o Tuli (Zimbábue) e o Africânder (África do Sul) foram chamadas de sangas, identificadas como *Bos taurus* e não como *Bos indicus* como era anteriormente. Os sangas tem cromossomo Y e DNAm taurino, portanto com ancestrais zebuínos e taurinos ou seja resultantes do cruzamento entre machos taurinos e fêmeas zebuínas com giba. Não apresentam cupim torácico característico mas um desenvolvimento da musculatura cérvico-torácica nos machos.

As raças africanas com cupim torácico típico de zebuínos são classificadas como *Bos indicus* (ou "taurindicus"). O exemplo é o Boran do Leste da África (Quênia), que é o mais zebuino das raças africanas com Y zebuino e DNAm taurino.

O Africânder e seus derivados como o Bonsmara e Belmond Red tem Y taurino e DNAm taurino.

A ORIGEM DO GADO CHINES

A análise da sequência do DNAm do gado da China indicam uma grande diversidade do gado chinês. Jia et al. (48) relatam que a proporção de *Bos taurus* e *Bos indicus* no gado chinês foi de 64,3 e 35,7%, respectivamente. De acordo com Lei et al. (49) o gado chinês revelou sequências tanto de taurinos como de zebuínos e a domesticação teria ocorrido na região de Yunnan-Guizhou.

O CONCEITO DE SUBESPÉCIE PARA TAURINOS E ZEBUÍNOS

A classificação de Lineu distingue duas espécies de bovinos domésticos: o *Bos indicus* com cupim e o *Bos taurus* sem cupim. Entretanto, a completa inter-fertilidade entre taurinos e zebuínos levaram os autores a considerarem ambos como subespécies.

A maioria classifica taurinos e zebuínos como duas subespécies separadas, definindo subespécie como “populações parcialmente diferenciadas dentro da espécie podendo diferir em um certo número de características e com padrões de distribuição geográfica” (34).

De acordo com a FAO (50), a subespécie *Bos taurus taurus* é da Europa setentrional (Norte) de clima temperado; são animais sem cupim, com chifres curtos, pele clara e pelos longos e o *Bos taurus indicus* são animais das regiões tropicais, com cupim, barbela abundante e pregueada, pele pigmentada e solta, pelos curtos e finos. Essas duas formas de bovinos divergiram em duas linhagens separadas, há 1,7 a 2,0 milhões de anos atrás, em uma clara dicotomia, mostrada pelo DNAm (35, 39).

O cupim, giba ou bossa, a principal característica dos zebuínos, é uma mistura de músculo, gordura e tecido conectivo. O cupim pode ser torácico (da 1ª. a 9ª. vértebra torácica) ou cervico-torácico (da 6ª. vértebra cervical a 5ª. vértebra torácica), não se sabendo ao certo a sua função. Nos cruzamentos de zebuínos com taurinos o cupim quase desaparece na descendência. Como exemplo, o gado girolando. As fêmeas F1 são desprovidas de cupim e os machos podem apresentar musculatura mais desenvolvida na região cervico-torácica. Não existem pesquisas formais sobre a genética desta característica. Aparentemente trata-se de uma característica monogênica recessiva ou poligênica com mais de um gene recessivo.

O CARIÓTIPO DOS BOVINOS - O POLIMORFISMO DO CROMOSSOMO Y

A revisão sobre o cariótipo dos bovinos por raça é uma tarefa complicada pois as dezenas de trabalhos sobre a descrição do cariótipo não especificam a raça ou identificam a origem da cultura de fibroblastos. Muitos são provenientes de animais taurinos europeus de corte ou mestiços de frigoríficos. Uma alternativa foi utilizar o Atlas de Cromossomos de Mamíferos, publicado em 1967 para os taurinos e em 1968 para os zebuínos com a descrição (considerada definitiva) para os dois cariótipos (51).

A análise dos cromossomos mitóticos mostrou um polimorfismo do cromossomo Y entre as duas formas de bovinos, com centrômero terminal (acrocêntrico) nos zebuínos e mediano ou submediano (meta/submetacêntrico) nos taurinos. Dessa forma, o cromossomo Y pode ser considerado como um marcador diferencial entre essas duas subespécies. A análise detalhada dos cromossomos é muitas vezes realizada quando há interesse desse estudo para saber a origem da raça ou na identificação de translocações equilibradas como a 1/29.

Pouco se conhece sobre a relação do Y e problemas de infertilidade nos bovinos como as microdeleções, por exemplo. O SRY (região do cromossomo Y responsável pela formação

de testículo). Nos taurinos está localizado na porção distal do braço longo e nos zebuínos na porção distal do pequeno braço curto. Nos humanos está localizado no braço curto.

O CARIÓTIPO ULTRA-ESTRUTURAL DOS BOVINOS - O COMPLEXO SINAPTONÊMICO (CS) POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA

O cariótipo ultra-estrutural é aquele resultante de uma técnica citológica que se baseia na análise dos cromossomos na meiose. Com isso só é possível visualizá-lo a partir de células germinativas utilizando microscopia eletrônica. Todavia isso não impede de inferir o cariótipo comum (de células mitóticas) a partir do cariótipo ultra-estrutural.

Durante a meiose I da divisão celular, cada cromossomo tem um parceiro (homólogo). O processo de pareamento dos homólogos acontece durante o estágio de paquíteno e é denominado sinapse. Esta requer, para a sua formação, uma estrutura protéica, denominada complexo sinaptonêmico (CS). Como nessa fase os cromossomos estão bastante desespiralizados, é possível uma análise da sua estrutura, daí o nome de cariótipo ultra-estrutural. A sinapse só acontece quando ocorrer homologia, portanto os indivíduos resultantes do cruzamento entre duas diferentes espécies a sinapse não acontece e a posterior disjunção dos homólogos é desorganizada, levando à esterilidade dos híbridos. É o que acontece com o produto resultante do cruzamento entre duas espécies diferentes (*Equus caballus* X *Equus asinus*) dando origem ao burro e a mula.

No caso do cruzamento entre duas subespécies como o *B. taurus* X *B. indicus* esta análise revelou diferenças no CS dos machos com um elevado grau de anormalidades de pareamento na meiose (52-54). Dollin, Murray e Gilles (53) analisam o CS dos produtos de cruzamento Brahman X Hereford e detectam que as anormalidades mais comuns foram pareamento parcial, falha no pareamento e entrelaçamentos.

AS ADAPTAÇÕES DE TAURINOS, ZEBUÍNOS E SANGAS

Atualmente as raças de bovinos estão agrupadas em três subdivisões: os taurinos que sofreram o processo da adaptação e estão ambientados a regiões de clima temperado; os zebuínos e o sanga africano adaptados às regiões de clima tropical. Os taurinos compreendem as raças continentais e britânicas que se caracterizam por não possuírem cupim, chifres geralmente curtos, pele clara e pelos longos. Os zebuínos foram adaptados a regiões de clima tropical, possuem cupim, chifres geralmente compridos, barbela abundante, pele pigmentada e solta, pelos curtos e finos. Os Sangas originaram-se da hibridização do zebu com raças taurinas africanas que foram introduzidas na África há 2.000 a 3.000 anos e também sofreram adaptações para o clima tropical. Pode ser distinguido do zebu puro por possuir cromossomo Y taurino, giba menor localizada mais próxima ao pescoço (região cérvico-torácica), barbela abundante, orelha média, e pele pigmentada. Exemplos de alguns sangas africanos ou tipo biológico africano existentes no Brasil são: Africânder, Tuli e Boran. O Africânder é originário da África do Sul, chifrudo com variedade mocha, chifres compridos saindo para baixo ou para trás. A pelagem é vermelha nas suas várias tonalidades com cromossomo Y taurino. Os machos chegam a pesar 1.000 kg. O Tuli, com cromossomo Y zebuino, é originário do Zimbábue (Sul da África) e o Boran da Somália e Etiópia.

Outros destaques nas propriedades dos zebuínos são: a baixa taxa de metabolismo basal, a maior atividade das glândulas sudoríparas e maior resistência ao calor, aos ecto e endo parasitas. Quanto ao comportamento, há uma maior tendência à dispersão nos taurinos e ajuntamento nos zebuínos quando são colocados em espaço aberto, bem como diferenças na emissão dos sons vocais.

EXISTEM ZEBUINOS “PUROS” NAS AMÉRICAS?

Marcadores de DNA mitocondrial foram utilizados por Meirelles et al. (55) para verificar a influência das raças taurinas na formação dos zebuínos na América do Sul e também na raça Brahman nos Estados Unidos. Estes últimos apresentaram DNAm exclusivamente de taurinos (e em menor escala, o nelore e o gir). Isso indica que na formação do Brahman houve cruzamento absorvente de machos zebuínos com fêmeas de origem taurina. A sequência completa do DNAm da raça Brahman foi analisada por Qu et al. (17) mostrando que haplótipos taurinos de gado de corte europeu estavam presentes em 90% do genoma desta raça.

Com isso podemos afirmar: nem sempre é perfeita a associação: presença de cupim = DNAm zebuínio + Y zebuínio ou ausência de cupim = mtDNA taurino + Y taurino.

REFERÊNCIAS

1. Mayr E. O que é a evolução? Rio de Janeiro: Editora Rocco Ltda; 2005.
2. Elsik CG, Tellam RL, Worley KC, Gibbs RA, Muzny DM, Weinstock GM, et al. The bovine hapmap consortium the genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*. 2009;324:522-8.
3. Hiendleder S, Lewalski H, Jenke A. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intra-species variation, taxonomy and domestication. *Cytogenet Genome Res*. 2008;120:150-6.
4. Edwards CJ, Magee DA, Park SD, McGettigan PA, Lohan AJ, Murphy A, et al. A complete mitochondrial genome sequence from a mesolithic wild aurochs (*Bos primigenius*). *PLoS One*. 2010;5:e9255.
5. Perez-Pardal L, Royo LJ, Beja-Pereira A, Chen S, Cantet RJC, Trairpe A, et al. Multiple paternal origins of domestic cattle revealed by Y-specific interspersed multilocus microsatellites. *Heredity*. 2010;105:511-9.
6. Mona S, Catalano G, Lari M, Larson G, Boscato P, Casoli A, et al. Population dynamic of the extinct European aurochs: genetic evidence of a north-south differentiation pattern and no evidence of post-glacial expansion. *BMC Evol Biol*. 2010;10:83.
7. Edwards CJ, Bellongino R, Scheu A, Chamberlain A, Tresset A, Vigne JD, et al. Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin of domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci*. 2007;274:1377-85.
8. Pruvost M, Schwarz R, Correia VB, Champlot S, Braguier S, Morel N, et al. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:739-44.
9. Beja-Pereira A, Caranelli D, Lalueza-Fox C, Vernesi C. The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103: 8113-8.
10. Fan B, Zhi-Qiang D, Gorbach DM, Rothschild MF. Development and application of high-density SNP Arrays in genomic studies of domestic animals. *Asian Aust J Anim Sci*. 2010;23:833-47.

11. Ihara N, Takasuga A, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M, Mizoguchi Y, et al. A comprehensive genetic map of cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res.* 2004;14:1987-98.
12. Li MH, Kantanen J. Genetic structure of Eurasian cattle (*Bos taurus*) based on microsatellites:clarification for their breed classification. *Anim Genet.* 2010;41:150-8.
13. Bollongino R, Elsner J, Vigne JD, Burger J. Y-SNPs do not indicate hybridization between European Auroque and domestic cattle. *PLoS One.* 2008;3:e3418.
14. Shodi M, Mukesh M, Mishra BP. Evaluation of genetic differentiation in *Bos indicus* cattle breeds from Marathwada region of India using microsatellite polymorphism. *Anim Biotechnol.* 2005;16:127-37.
15. Freeman AR, Bradley DG, Nagda S, Gibson JP, Hanotte O. Combination of multiple microsatellite data sets to investigate genetic diversity and admixture of domestic cattle. *Anim Genet.* 2005;37:1-9.
16. Miretti MM, Pereira Jr HA, Poli MA, Contel EPB, Ferro JA. African-derived mitochondria in South American native cattle breeds (*Bos taurus*): evidence of a new taurine mitochondrial lineage. *J Hered.* 2002;93:323-30.
17. Qu K, Wu G, Liao X, Jin X, Shao G, Yang G, et al. Mitochondrial DNA D-loop variation and genetic background of Brahman cattle. *Zool Res.* 2006;27:615-20.
18. Liu WS, Beattie CW, Ponce de León FA. Bovine Y chromosome microsatellite polymorphisms. *Cytogenet Genome Res.* 2003;102:53-8.
19. Bradley DG, MacHugh DE, Loftus RT, Sow RS, Hoste CH, Cunningham EP. Zebu-taurine variation in Y chromosome DNA: a sensitive assay for genetic introgression in West African trypanotolerant cattle population. *Anim Genet.* 1994;25:7-12.
20. MacHugh DE, Shriver MD, Loftus RT, Cunningham P, Bradley DG. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics.* 1997;146:1071-86.
21. Hanotte O, Tawah CL, Bradley DG, Okomo M, Verjee Y, Ochieng J, et al. Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos Taurus* an indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-Saharan African cattle breeds. *Mol Ecol.* 2000;9:387-96.
22. Mannen H, Kohno M, Nagat Y, Tsuji S, Bradley DG. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Mol Phylogenet Evol.* 2004;32:539-44.
23. Gotherström A, Anderung C, Hellborg L, Elburg R, Smith C, Bradley DG, et al. Cattle domestication in the Near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;272:2345-50.
24. Farah BF. *DNA Segredos e mistérios.* São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos; 2007.

25. Wiggans GR, Sonstegard TS, VanRaden PM, Matukumalli LK, Schnabel RD, Taylor JF, et al. Selection of single-nucleotide polymorphism and quality of genotypes used in genomic evaluation of dairy cattle in the United States and Canada. *J Dairy Sci.* 2009;92:3431-6.
26. Hassanin A, Douzery EJP. Evolutionary affinity of the enigmatic Saola (*Pseudorix nghetinhensis*) in the context of the molecular phylogeny of Bovidae. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1999;266:893-900.
27. Futuyama DJ. *Biologia evolutiva*. 2ª ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética; 1997.
28. Rose KD. On the origin of the order Artiodactyla. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:1705-9.
29. Benton MJ. *Paleontologia dos vertebrados*. São Paulo: Atheneu; 2006.
30. Hassanin A, Douzery EJP. Molecular and morphological phylogenies of Ruminantia and the alternative position of the Moschidae. *Syst Biol.* 2003;52:206-28.
31. Buntjer JB, Hoff IA, Lenstra JA. Artiodactyl interspersed DNA repeat in cetacean genome. *J Mol Evol.* 1997;4:66-9.
32. Athanassof N. *Manual do criador de bovinos*. 6ª ed. São Paulo: Melhoramentos; 1957.
33. Garcia-Fierro B. *Ganado vacuno*. Barcelona: Salvat; 1956.
34. Epstein H, Mason IL. Cattle. In: Mason IL. *Evolution of domesticated animals*. London: Longman; 1984. p.6-27.
35. Bailey JF, Richards MB, Macauley VA, Colson IB, James IT, Bradley DG, et al. Ancient DNA suggests a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1996;263:1467.
36. Grigson C. The craniology and relationship of four species of Bos 5. *Bos indicus*. *J Archaeol Sci.* 1980;7:3-32.
37. Felius M, Koolmees PA, Theunissen B. On the breeds of cattle – historic and current classification. *Diversity.* 2011;3:660-92.
38. Troy CS, MacHugh DE, Balley JF, Magee DA, Loftus RT, Cunningham P, et al. Genetic evidence for Near-Eastern origin of European cattle. *Nature.* 2001;410:1088-91.
39. Loftus RT, MacHugh DE, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham P. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:2757-61.
40. Loftus RT, MacHugh DE, Negere LO, Balain DS, Badi AM, Bradley DG. Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. *Anim Genet.* 1994;25:265-71.

41. Bradley DG, Loftus RT, Cunningham P, MacHugh DE. Genetics and domestic cattle origins. *Evol Anthropol.* 1998;6:79-86.
42. Loftus RT, Ertugrul O, Harba AH, El-Barody MAA, MacHugh DE, Park SDE, et al. A microsatellite survey of cattle from centre of origin: the Near East. *Mol Ecol.* 1999;8:2015-22.
43. Cymbrom T, Freeman AR, Malheiro MI, Vigne JD, Bradkey DG. Microsatellite diversity suggests different histories for Mediterranean and Northern European cattle populations. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;272:1837-43.
44. Negrini R, Nijman IJ, Milanesi E. Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting. *Anim Genet.* 2007;38:60-6.
45. Chen S, Lin BZ, Baig M, Lopes RJ, Santos AM, Magee DA, et al. Zebu cattle are an exclusive legacy of the South Asia neolithic. *Mol Biol Evol.* 2010;27:1-6.
46. Anderung C, Hellborg L, Sedon J, Hanotte O, Göterström A. Investigation of X-and Y-specific single nucleotide polymorphism in taurine (*Bos taurus*) and indicine (*Bos indicus*) cattle. *Anim Genet.* 2007;38:595-600.
47. Frisch JE, Drinkwater R, Harrison B, Johnson S. Classification of the southern African sanga and East African shorthorned zebu. *Anim Genet.* 1997;28:77-83.
48. Jia S, Chen H, Zang G, Wang S, Lei C, Yao R, et al. Genetic variation of mitochondrial D-Loop Region and Evolution analysis in some Chinese cattle breed. *J Genet Genomics.* 2007;34:510-8.
49. Lei CZ, Chen H, Zang HC, Cai X, Liu RY, Luo LY, et al. Origin and phylogeographical structure of Chinese cattle. *Anim Genet.* 2006;37:579-82.
50. Food and Agriculture Organization - FAO. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture - first draft. Roma; 2006.
51. Hsu TC, Benirschke K. An atlas of mammalian chromosomes. New York: Springer; 1967.
52. Switonski M, Ansari HA, Mathew A, Jung HR, Stranzinger G. Synaptonemal complex analysis in primary spermatocytes of cattle X zebu hybrids (*Bos Taurus* X *Bos indicus*). *J Anim Breed Genet.* 1990;107:229-38.
53. Dollin AE, Murray JD, Gilles CB. Synaptonemal complex analysis of hybrid cattle. II. *Bos indicus* X *Bos taurus* F1 and backcross hybrids. *Genome.* 1991;34:220-7.
54. Switonski M, Stranzinger G. Studies of Synaptonemal complexes in farm mammals – a review. *J Hered.* 1998;89:473-80.
55. Meirelles FV, Rosa AJM, Lobo RB, Garcia JM, Smith LC, Duarte AM. Is the american zebu really *Bos indicus*? *Genet Mol Biol.* 1999;22:343-6.

Recebido em: 26/04/12

Aceito em: 14/12/12

ALTERAÇÕES SENIS DO ENCÉFALO DE CANINOS – ASPECTOS IMAGINOLÓGICOS

Viviam Rocco Babicsak¹
Luiz Carlos Vulcano²

RESUMO

Estudos relacionados à verificação das alterações senis no encéfalo de cães têm se tornado de grande importância devido ao crescente atendimento médico de caninos idosos. A determinação dos achados encefálicos em um processo normal de senilidade possibilita a identificação de anormalidades durante o mesmo. Na condição normal desse processo, observa-se redução volumétrica de diversas regiões encefálicas associada ao alargamento dos sulcos cerebrais; discreta a moderada dilatação dos ventrículos laterais; diminuição na altura do hipocampo e alargamento dos cornos temporais. Redução da atenuação das substâncias branca e cinzenta, assim como, alterações de intensidade, também podem ser observadas nas imagens encefálicas por tomografia computadorizada e ressonância magnética, respectivamente, de indivíduos idosos. Nessa última modalidade de imagem, áreas hiperintensas na sequência T2 e hipointensas em T1 foram descritas no encéfalo de humanos e caninos, respectivamente. Nestes pacientes, um aumento da frequência destas lesões ocorre conforme o avanço da idade.

Palavras-chave: cão, encéfalo, envelhecimento, ressonância magnética tomografia computadorizada.

AGING CHANGES OF CANINE BRAIN – IMAGING ASPECTS

ABSTRACT

Studies related to the verification of the aging changes in the brain of dogs became very important due to the growing medical care of elderly dogs. The determination of the findings in a normal aging brain enables the identification of abnormalities in this process. In normal condition, there are volumetric reduction of several brain regions associated with widening of cerebral sulci; mild to moderate dilatation of the lateral ventricles; reduction in the height of the hippocampus and enlargement of the temporal horns. Decrease in the attenuation of white and gray matter as well as changes in intensity can also be observed in the brain images by computed tomography and magnetic resonance imaging, respectively, in elderly patients. In the latter imaging modality, hyperintense areas on T2-weighted and hypointense areas on T1-weighted images have already been described in the brain of humans and dogs, respectively. In these patients, an increase in the frequency of these lesions occurs with advancing age.

Keywords: aging, brain, computed tomography, dog, magnetic resonance imaging.

¹ Pós-graduanda da Área de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

² Docente da Área de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

ALTERACIONES SENILES EN EL CEREBRO DE LOS PERROS - ASPECTOS DE IMAGENOLÓGICOS

RESUMEN

Estudios relacionados con la verificación de las alteraciones seniles en el cerebro de los perros se han tornado muy importantes debido a la creciente atención a la salud de los perros de edad avanzada. La determinación de los hallazgos normales durante el proceso de envejecimiento permite la identificación de alteraciones durante el mismo. En la condición normal de este proceso, se puede identificar reducción volumétrica de varias regiones del cerebro asociado a ensanchamiento de los surcos cerebrales; leve a moderada dilatación de los ventrículos laterales; disminución en la altura del hipocampo y ensanchamiento de los cuernos temporales. En pacientes de edad avanzada es posible observar reducción de la atenuación de la sustancia blanca y gris, así como alteraciones de la intensidad en las imágenes cerebrales utilizando la tomografía computarizada y la resonancia magnética, respectivamente. En esta última modalidad de imagen se han descrito áreas hiperintensas en la secuencia T2 e hipointensas en T1 en el cerebro de seres humanos y caninos, respectivamente. En estos pacientes, ocurre un aumento de la frecuencia de estas lesiones con el envejecimiento.

Palabras claves: cerebro, envejecimiento, perro, resonancia magnética, tomografía computarizada.

INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida dos animais tem resultado em maior frequência de pacientes idosos no atendimento das clínicas e hospitais veterinários. Durante o processo de senilidade ocorrem alterações da normalidade estrutural e funcional nos órgãos e tecidos do organismo. No sistema neurológico, essas alterações resultam em distúrbios na habilidade cognitiva que inclui elementos como inteligência, memória, atenção, função executora e capacidade visuoespacial (1). Nos caninos, as alterações cognitivas que mais ocorrem são: diminuição na atividade física, distúrbio no ciclo de vigília e sono, desorientação e perda do treinamento doméstico (2). Frente a esses fatos, torna-se necessária a verificação das alterações senis por meio de modalidades de imagem de modo a possibilitar a diferenciação de processos normais e anormais, e identificar distúrbios encefálicos, em consequência.

Essa revisão de literatura abrange os achados no parênquima encefálico de pequenos animais, durante o processo de senilidade, visibilizados por meio de métodos imagiológicos como a tomografia computadorizada e ressonância magnética. Alterações senis do parênquima encefálico de humanos também foram consideradas nessa revisão, uma vez que poucos estudos com animais foram realizados. Indivíduos da espécie canina já foram utilizados como modelos em algumas pesquisas humanas sobre senilidade devido às semelhanças entre essas duas espécies, sendo assim, conclui-se que alterações encefálicas identificadas em humanos podem ser extrapoladas para os pacientes caninos.

DESENVOLVIMENTO

A atrofia cerebral, normalmente identificada em pacientes idosos, pode ser determinada por meio da observação de dilatação ventricular e alargamento dos sulcos cerebrais, que secundariamente apresentam-se preenchidos por líquido cerebrospinal. Em humanos, a diminuição do volume tecidual ocorre inicialmente na substância cinzenta, e tardiamente, na substância branca (3), sendo a redução desta primeira região provavelmente secundária a atrofia neuronal (4) e o declínio desta última porção decorrente da desmielinização e da

diminuição do comprimento das fibras mielinizadas (5). No estudo de Kruggel (6), foi verificado que, em humanos, 70% da atrofia cerebral total é decorrente da perda de volume da substância cinzenta, enquanto que, somente 30% é secundário à diminuição de volume da substância branca. De acordo com o Ge et al. (7), a perda da substância cinzenta começa a ocorrer em torno dos 20 anos de idade em humanos, sendo linear e constante a redução após essa idade. Com relação à substância branca, esta apresenta um aumento de volume até a idade de 40 anos e um decréscimo após essa mesma idade. Comparando-se indivíduos humanos com idade menor e maior que 50 anos, foi verificada uma diferença significativa no volume de substância branca (7). Courchesne et al. (8), observaram redução de 12% do volume cerebral total nas mulheres em comparação aos homens, porém, não foram identificadas alterações entre os volumes da substância cinzenta. Entretanto, no estudo de Good et al. (9), a taxa de volume da substância cinzenta foi maior em homens que em mulheres.

Sandor et al. (10), avaliaram imagens tomográficas encefálicas de 64 indivíduos humanos saudáveis com idade entre 31 a 87 anos; a atrofia cerebral foi verificada no sulco e giro interhemisféricos, ramo marginal do sulco cingulado, sulco central e pós-central, sulco intraparietal e sulco parietoccipital. Foram visibilizadas atrofia mais pronunciada nos sulcos central e pós-central na região esquerda, e no sulco intraparietal na porção direita. Neste também foi identificado que a atrofia ocorreu primeiro no lobo parietal superior, e foi mais pronunciada na região direita (10). No lobo temporal, entretanto, a atrofia giral, quando presente, ocorreu de forma mais evidente na porção esquerda (11). Nesse mesmo estudo, não foi identificada atrofia na região do lobo frontal, embora outros autores a tenham verificado em estudos post-mortem. No entanto, os autores acreditam que a não verificação da atrofia do lobo frontal ocorreu devido a falhas na metodologia (10). Segundo Beason-Held e Horwitz (1), as regiões parassagitais frontais, em conjunto com as temporais, são as áreas corticais mais afetadas na atrofia.

Segundo Tapp e Siwak (3), em caninos, a redução da substância cinzenta ocorre bilateralmente nos giros frontal, orbital e ectosilviano; bulbo olfatório; e núcleo olivar superior no tronco encefálico. Unilateralmente, a perda tecidual ocorre nos giros proreal, silviano e suprasilviano; cerebelo e núcleos do tronco encefálico. A redução de volume cerebral ocorre diferentemente em machos e fêmeas uma vez que a diminuição do lobo frontal ocorre de forma mais proeminente em machos, enquanto que, nas fêmeas, essa redução é mais comumente observada nos lobos temporais.

Com relação à substância branca, em caninos, a redução de volume se dá de forma extensa e bilateral, afetando a cápsula interna (incluindo uma discreta porção do genu do corpo caloso), tratos de substância branca do cingulado anterior, e o álveo do hipocampo. A atrofia na cápsula interna é mais observada em machos, enquanto que, nas fêmeas, a perda ocorre primariamente nos álveos do hipocampo (3).

Resnick et al. (12), avaliaram imagens seriadas de ressonância magnética encefálica de 92 indivíduos humanos com idade entre 59 a 85 anos, realizadas no período de 2 ou 4 anos, e observaram redução tecidual das substâncias branca e cinzenta. Apesar de parecer ter ocorrido uma maior perda tecidual da substância branca em comparação com a cinzenta, não foi identificada uma diferença significativa entre os mesmos. Neste mesmo estudo, foi verificado que os lobos frontais e parietais apresentaram uma maior vulnerabilidade à perda tecidual do que os lobos temporais e occipitais. Avaliando-se a substância cinzenta, foram observadas alterações longitudinais nas seguintes estruturas: córtex cingular, insular, orbital, frontal e parietal inferiores, e regiões temporais mesiais, em menor extensão nessa última porção. Os autores sugerem que a perda de tecido nesses locais pode ser atribuída às consequências neurotóxicas da deposição de amilóide que levam a uma apoptose neuronal, pelo menos, parcial. A perda neuronal causada pela deposição de amilóide é dada como um dos possíveis e principais fatores de desenvolvimento da demência na doença de Alzheimer. Resnick e

colaboradores (12) acreditam que os indivíduos que apresentam alterações, em uma maior taxa, na região frontal orbital e temporal mesial, possuem uma maior vulnerabilidade à doença. Segundo Petersen et al. (13), há uma significativa associação entre a perda de tecido do lobo temporal mesial, particularmente do hipocampo e córtex entorhinal, e a doença de Alzheimer.

A incidência de amiloidose cerebrovascular em cães, no estudo de Borràs, Ferrer e Pumarolo (14) foi maior que a reportada em humanos idosos (15), sendo a leptomeninge e as regiões corticais frontais e temporais, as mais afetadas tanto em cães (16) quanto em humanos (15). Segundo Head (17), em humanos e em caninos, o córtex pré-frontal é a região em que a beta-amilóide se deposita de forma mais precoce e consistente, enquanto que, o lobo occipital, é a porção em que a deposição de beta-amilóide ocorre mais tardiamente (18). Com relação ao hipocampo e cerebelo, no estudo de Borràs, Ferrer e Pumarolo (14), a deposição amilóide foi verificada ocasionalmente nesses locais, enquanto que, no núcleo basal e tronco encefálico, a deposição amilóide não foi observada em nenhum dos caninos (14). A deposição beta-amilóide é comumente identificada tanto no processo de senilidade normal quanto patológica, e de acordo com Colle et al. (19), há uma significativa associação entre a extensão da deposição de beta-amilóide e a severidade dos distúrbios comportamentais em cães.

A interação da beta-amilóide com as células endoteliais resulta na angiopatia amilóide que causa uma vasoconstrição e uma consequente hipoperfusão cerebral crônica, além de provocar danos na barreira hematoencefálica (20). Dessa forma, Su et al. (21), realizaram um estudo com o objetivo de identificar o volume cerebral vascular e a permeabilidade da barreira hematoencefálica por meio de um exame dinâmico de ressonância magnética contrastada em 18 cães da raça beagle com idade variando entre 4 a 15 anos. Uma lenta taxa de decaimento da cinética intersticial, após a administração do meio de contraste, sugeriu um extravasamento do mesmo pela barreira hematoencefálica. Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas do índice de permeabilidade da barreira hematoencefálica conforme o avanço da idade. No entanto, este fato pode ser decorrente da exclusão de áreas de atrofia cerebral. Apesar disso, segundo os autores, houve uma tendência do índice de permeabilidade da barreira hematoencefálica em aumentar de acordo com a idade. Neste estudo, em um cão de 6 anos de idade que apresentava dilatação ventricular não usual e disfunção na barreira hematoencefálica, foi identificada deposição amilóide no córtex parietal no exame post-mortem, fato que comumente é observado somente em beagles com idade acima de 9 anos. Devido à ausência de atrofia cortical nesse animal, os autores sugerem que alterações na integridade da barreira hematoencefálica precedem a atrofia, podendo esta ser, uma consequência precoce da senilidade cerebral.

Scahill et al. (22), mensuraram o volume cerebral total, temporal, hipocampal e ventricular, por meio de avaliação de imagens seriadas de ressonância magnética em 39 indivíduos humanos saudáveis, e observaram taxa anual de atrofia cerebral total similar, tanto no estudo longitudinal (0,32%), como no transversal (0,33%), assim como o valor médio anual de alteração do volume ventricular (transversal: 521 mm³/ longitudinal: 650mm³). No estudo longitudinal, as taxas de atrofia anual hipocampal e temporal foram de 0,82% e 0,62%, respectivamente. Comparando-se os valores de atrofia antes e depois da idade de 70 anos, foi constatada uma diferença significativa somente para o hipocampo.

No estudo de Pugliese et al. (23), no qual as imagens cerebrais de ressonância magnética de 98 cães idosos de 27 raças diferentes foram avaliadas, foi identificado que o hipocampo sofre uma grande redução volumétrica nesses animais, assim como em humanos, podendo ser considerado um marcador precoce do processo de senilidade no parênquima cerebral.

No entanto, apesar de diversos autores indicarem a atrofia do hipocampo, outros revelam que não há alterações no volume desse tecido durante a senilidade em humanos (9,24). Segundo Szentkuti et al. (24), que estudaram o hipocampo de 13 indivíduos humanos

jovens e 22 idosos por meio de exames de ressonância magnética volumétrica, por difusão e com espectroscopia, as alterações em hipocampo são predominantemente metabólicas que volumétricas.

Estudos humanos que avaliaram o tálamo também demonstraram resultados divergentes uma vez que um revelou uma redução volumétrica desta estrutura semelhantemente ao que ocorre na substância cinzenta (25), e outro, indicou não haver alteração senil significativa no volume talâmico (26). Com relação ao cerebelo, foi verificado que, este apresenta um decréscimo volumétrico durante o envelhecimento, tanto de sua substância branca como cinzenta, ambas de forma curvilínea. Dessa forma, uma diminuição volumétrica cerebelar acelerada pode ser normal, fato que dificulta a diferenciação de processos senis normais e patológicos (27). Estudos relacionados ao tronco encefálico apresentam resultados divergentes. Enquanto um revela que o volume desta estrutura não declina com a idade (28), outro indica que o volume do tronco encefálico diminui de acordo com a idade e de forma quadrática, assim como ocorre com a substância branca (27).

Os resultados dos diversos estudos sobre a redução volumétrica, realizados tanto em cães como em humanos idosos, estão dispostos no quadro 1.

Quadro 1. Quadro demonstrando as regiões encefálicas que sofreram um declínio de seu volume durante o processo de senilidade nos diversos estudos realizados em humanos e caninos.

Humanos	Cães
sulco central e pós-central	giro ectosilviano
sulco e giro interhemisféricos	giro frontal
sulco intraparietal	giro orbital
sulco parietoccipital	giro proreal
ramo marginal do sulco cingulado	giro silviano
córtex cingular	giro suprasilviano
córtex insular	bulbo olfatório
córtex orbital	lobo frontal
córtex frontal inferior	lobo temporal
córtex parietal inferior	tratos de substância branca do cingulado anterior;
regiões parassagitais frontais	porção do genu do corpo caloso
regiões parassagitais temporais	cápsula interna
regiões temporais mesiais	hipocampo
tálamo	núcleos do tronco encefálico;
hipocampo	cerebelo
tronco encefálico	
cerebelo	

O fluido cerebrospinal extraventricular pode ser considerado o elemento mais importante na avaliação da atrofia cerebral uma vez que o aumento no volume ventricular representa somente uma pequena parte do volume total (29). Matsumae et al. (29), realizaram ressonância magnética em 49 indivíduos humanos; jovens (grupo I), adultos (grupo II) e idosos (grupo III), e as porcentagens do volume extraventricular foram calculadas para todos os grupos. Com relação às mulheres, os valores encontrados foram de 6,36% no grupo dos indivíduos jovens (I), 7,97% no grupo dos adultos (II) e 11,44% no grupo dos idosos (III). As porcentagens obtidas para os homens foram as seguintes: 6,17, 8,13 e 13,56, para os grupos I, II e III, respectivamente. Neste estudo, também foi identificado que em homens, o volume do fluido cerebrospinal extraventricular é maior que nas mulheres, apesar da análise estatística não ter indicado uma diferença significativa entre os mesmos.

Com relação ao volume de fluido cerebroespinal intracranial total, foi realizado um estudo com intuito de se determinar seu percentual em indivíduos humanos, adultos e idosos, por meio da avaliação de imagens tomográficas. Os valores do volume de fluido cerebroespinal intracranial total encontrados em humanos, para cada década, da primeira a nona, foram as seguintes, respectivamente: 7,281% \pm 0,522, 6,020% \pm 0,359, 6,108% \pm 0,214, 6,340% \pm 0,218, 7,443% \pm 0,265, 8,309% \pm 0,287, 9,011% \pm 0,316, 11,681% \pm 0,747 e 14,200% \pm 0,841. Neste estudo, foi constatado um aumento significativo das porcentagens do volume de fluido cerebroespinal intracranial total após a sexta década de idade, considerado secundário à atrofia cerebral decorrente do processo de senilidade (30).

Um estudo similar foi realizado por Matsumae et al. (29), no entanto, a mensuração foi realizada por meio de imagens de ressonância magnética, que proporciona resultados mais fidedignos, uma vez que pela tomografia computadorizada há uma dificuldade em diferenciar fluido cerebroespinal extraventricular do tecido cerebral. A justificativa para isso é a existência de artefatos decorrentes do osso craniano e a menor resolução e contraste das imagens tomográficas em comparação com a ressonância magnética. Neste estudo, em que a ressonância magnética foi realizada em 49 pacientes humanos jovens (grupo I), adultos (grupo II) e idosos (grupo III), foi constatado um aumento do volume de fluido cerebroespinal intracranial total de acordo com o avanço da idade, sendo considerado mais pronunciado entre o grupo dos indivíduos de meia idade e idosos. As porcentagens aproximadas relacionadas ao volume de líquido cerebroespinal encontradas nas mulheres deste estudo foram: 7,56%, 9,57% e 13,86%, nos grupos I, II e III, respectivamente. Enquanto que, nos homens, os valores encontrados foram 7,48% no grupo I, 9,25% no grupo II e 15,93%, no grupo III. O valor médio de aumento do volume de fluido cerebroespinal total anual encontrado neste estudo foi de 3,4 cm³ em homens e 2,5 cm³ em mulheres.

O aumento do volume de fluido cerebroespinal ventricular também é um fator comumente identificado em indivíduos idosos, no entanto, uma condição severa está geralmente relacionada a uma doença (1).

No estudo de Borràs, Ferrer e Pumarolo (14) foi identificada alta frequência de dilatação ventricular, discreta a moderada, em cães idosos (60%), sendo esta verificada constantemente em animais acima de 14 anos de idade. O aumento das dimensões do sistema ventricular é originado possivelmente em consequência da perda de tecido neuronal, uma vez que, nesse mesmo estudo foram encontrados satelitose e neuronofagia, principalmente em córtex cerebral frontal e tálamo dorsal.

No estudo de Scahill et al. (22), em humanos, foi identificada aceleração na taxa de aumento ventricular, entretanto, como neste estudo não foi verificada alteração ou diferença significativa das taxas de perda de volume tecidual, constatou-se que não somente a atrofia cerebral justifica o aumento ventricular conforme o avanço da idade.

No estudo longitudinal de Su et al. (31), no qual alterações estruturais cerebrais foram investigadas na ressonância magnética de 47 cães da raça beagle em um período de 3 anos, 26 de 47 (55,3%) animais apresentaram dilatação ventricular, comparando-se as imagens do segundo ano em relação ao primeiro, e 35 de 41 cães (85,37%) apresentaram maior diâmetro ventricular no terceiro ano do estudo.

A avaliação de 140 pacientes humanos submetidos à tomografia computadorizada em um hospital em Massachusetts revelou que o terceiro ventrículo não é visibilizado ou apresenta pequenas dimensões em indivíduos com idade inferior a 40 anos, entretanto, este pode ser prontamente e claramente identificado em pessoas com 50 anos de idade (32).

González-Soriano et al. (33), realizaram avaliação post-mortem do sistema ventricular de 47 cães da raça pastor alemão adultos e idosos, e constataram significativa alteração das dimensões da maioria das estruturas do sistema ventricular entre os dois grupos de animais, porém, não identificaram diferença na largura do terceiro ventrículo. A justificativa para esse fato pode ser a existência de sistema de drenagem do líquido cerebroespinal nessa altura.

Nenhuma diferença relacionada às dimensões do sistema ventricular entre machos e fêmeas foi observada.

Pugliese et al. (23), identificaram em imagens de ressonância magnética, dilatação ventricular mais severa em animais mesaticefálicos e braquicefálicos, possivelmente devido a sua predisposição genética em desenvolver essa característica. A partir dos resultados do estudo, os autores propuseram a utilização de uma tabela para a classificação de atrofia cerebral, por meio da avaliação visual, em escores que variam de 0 a 4 (figura 1). No escore 0 desta tabela, não se verifica a presença de nenhuma alteração. No escore 1, observa-se uma dilatação ventricular, que, no escore 2, é identificada em associação a um alargamento dos sulcos cerebrais. Na classificação 3, todos os itens anteriores são verificados em conjunto com uma diminuição da altura do hipocampo, e no escore 4, todas essas alterações são visibilizadas em associação a um aumento da largura do corno temporal. Esses itens avaliados na classificação evoluem proporcionalmente conforme o escore de atrofia cerebral.

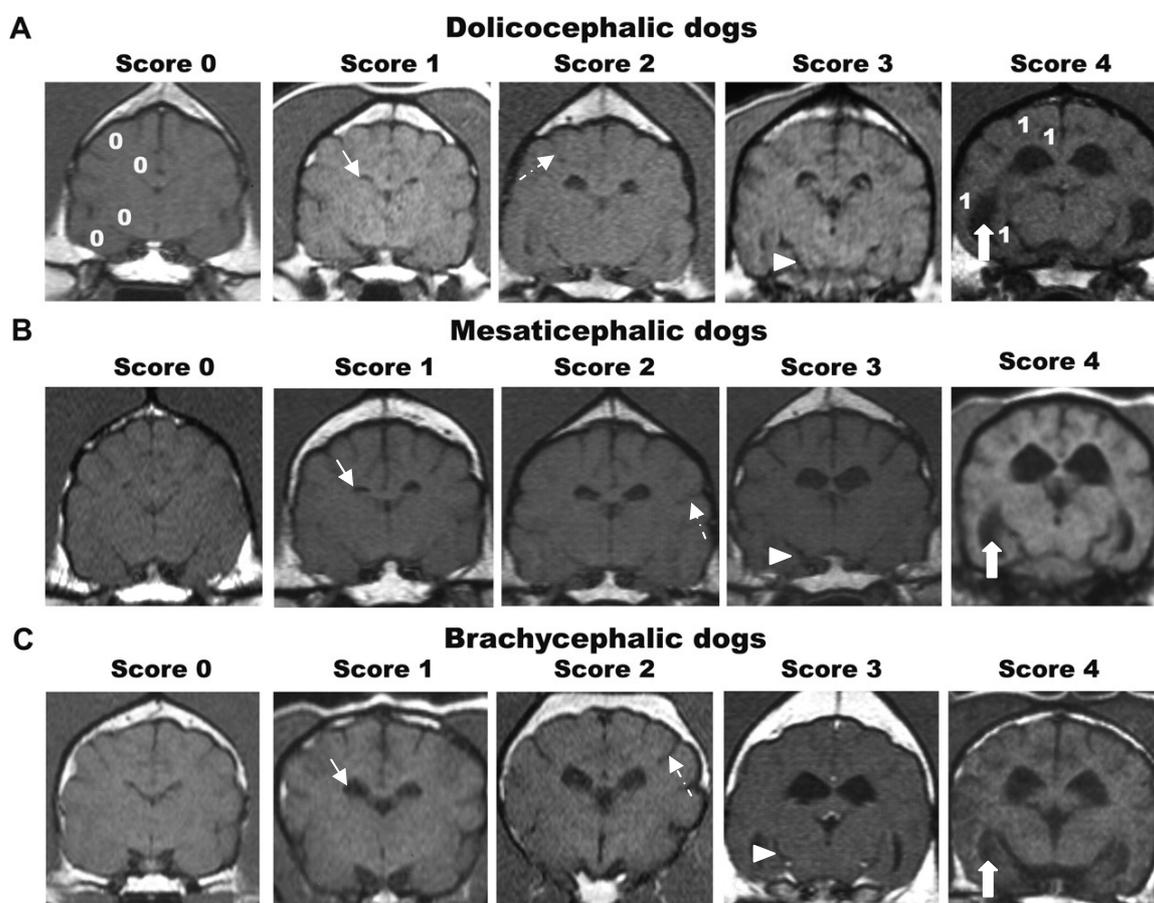


Figura 1. Imagens de ressonância magnética do parênquima cerebral de cães com diferentes conformações cranianas (A-dolicocefálicos, B-mesaticefálicos e C-braquicefálicos) na sequência T1-weighted, ilustrando a dilatação ventricular (seta contínua), alargamento dos sulcos cerebrais (seta em traçados), diminuição da altura do hipocampo (cabeça de seta) e aumento da largura do corno temporal (seta larga). Fonte: Pugliese et al. (23).

Com relação aos valores médios de atenuação, em unidades Hounsfield (HU), nas imagens tomográficas em humanos, há diminuição destes, tanto na substância cinzenta quanto na branca; a redução da primeira substância ocorre predominantemente no córtex frontal e temporal, e da última, particularmente em região frontal (34). A diminuição da atenuação na substância cinzenta é resultante de uma perda de densidade sináptica, que ocorre normalmente no processo de senilidade, devido a uma redução da perfusão cerebral (35). A redução dos

valores na substância branca (leucoaraiose) ocorre em decorrência de degeneração axonal anterógrada, que apresenta uma correlação direta com a atrofia cerebral. Alterações vasculares isquêmicas, principalmente em indivíduos com hipertensão, também podem contribuir e acentuar o processo de leucoaraiose (36). Apesar da redução de densidade da substância cinzenta e branca estar significativamente correlacionada com o avanço da idade, este primeiro elemento está ainda mais associado (34).

Em humanos, alterações no sinal do parênquima cerebral também podem ser identificadas no exame de ressonância magnética. Neste, áreas hiperintensas podem ser observadas tanto em região periventricular como na porção profunda da substância branca na sequência T2-weighted. Esse primeiro tipo de intensificação pode ser encontrado em região frontal ou occipital às margens ventriculares ou em todo o redor desta estrutura como um fino trajeto linear. Esta hiperintensidade periventricular possivelmente é decorrente de uma ruptura do epêndima ventricular, o que resulta em um aumento no conteúdo de água na mielina adjacente, provocando desmielinização e gliose. Neste último tipo, uma hiperintensidade pode ser observada como uma área difusa (geralmente em hipertensivos) ou focal puntiforme em região subcortical. Esta, que representa a gliose, desmielinização e atrofia dos axônios e mielina adjacente às estruturas vasculares, apresenta possível origem isquêmica (1). Essas hiperintensidades, que aumentam em frequência conforme a idade, foram verificadas por Meyer, Kawamura e Terayama (37), em 30% da população humana com idade acima de 60 anos.

Awad et al. (38), avaliaram imagens de ressonância magnética de 240 pacientes humanos de diversas idades (variando de 5 a 82 anos), e também encontraram áreas focais hiperintensas parenquimatosas na sequência T2-weighted. Essas, que não podem ser identificadas em imagens tomográficas, nem mesmo de boa qualidade, foram verificadas em 22% dos indivíduos com idade entre 0 e 20 e entre 21 a 40 anos, em 51% dos pacientes com 41 a 60 anos e 92% dos indivíduos com mais de 60 anos neste estudo. Uma prévia história de isquemia cerebral em indivíduos com mais de 50 anos foi associada a um aumento na incidência dessas lesões. Nestes pacientes, as imagens foram visibilizadas em múltiplas confluentes áreas bilateralmente. Em humanos com histórico de hipertensão também foi observado um aumento na frequência dessas lesões, que geralmente apresentaram-se como múltiplas e não confluentes. Outro fator relacionado com a incidência e a severidade dessas lesões é a idade, uma vez que essas áreas foram visibilizadas em 33 pacientes idosos participantes deste estudo, sem histórico de hipertensão, doença cerebrovascular, diabetes mellitus, doença coronariana e demência.

Em cães, alterações de intensidade nas imagens encefálicas por ressonância magnética também já foram observadas. No estudo de Su et al. (31), lesões cavitárias hipointensas foram verificadas na sequência T1-weighted na ressonância magnética de cães beagles, representando infartos lacunares e cistos, que podem estar relacionados à alterações cerebrovasculares ou neurocisticercose, respectivamente, se menores que 1 cm de diâmetro, ou infartos, em casos de lesões com diâmetros maiores que as descritas anteriormente (figura 2). Estas alterações que apresentaram limites pouco definidos e bordos irregulares resultaram, em alguns casos, em um discreto efeito de massa negativo. No segundo ano deste estudo longitudinal, essas lesões foram visibilizadas em 12 de 47 dos cães (25%), enquanto que, no terceiro e último ano, essas alterações foram identificadas em 22 de 41 animais (54%). Essas lesões foram visibilizadas em maior frequência, no último ano do estudo longitudinal, nas seguintes áreas, em ordem decrescente: núcleo caudato, córtex frontal, córtex cerebral (incluindo as outras regiões), bulbo olfatório e tálamo. No segundo e terceiro anos do estudo, foi verificado que mais de 76% das lesões estavam localizadas em córtex frontal e núcleo caudato. A razão para a ocorrência nessa primeira região é a deposição de beta-amilóide que ocorre mais frequente e precocemente nessas porções em comparação a outras áreas corticais e subcorticais (18). Com relação ao núcleo caudato, essas lesões ocorrem em uma maior

frequência nessa região possivelmente devido à existência de uma rede neural extensa entre córtex frontal e as regiões tálamo-caudato (39).

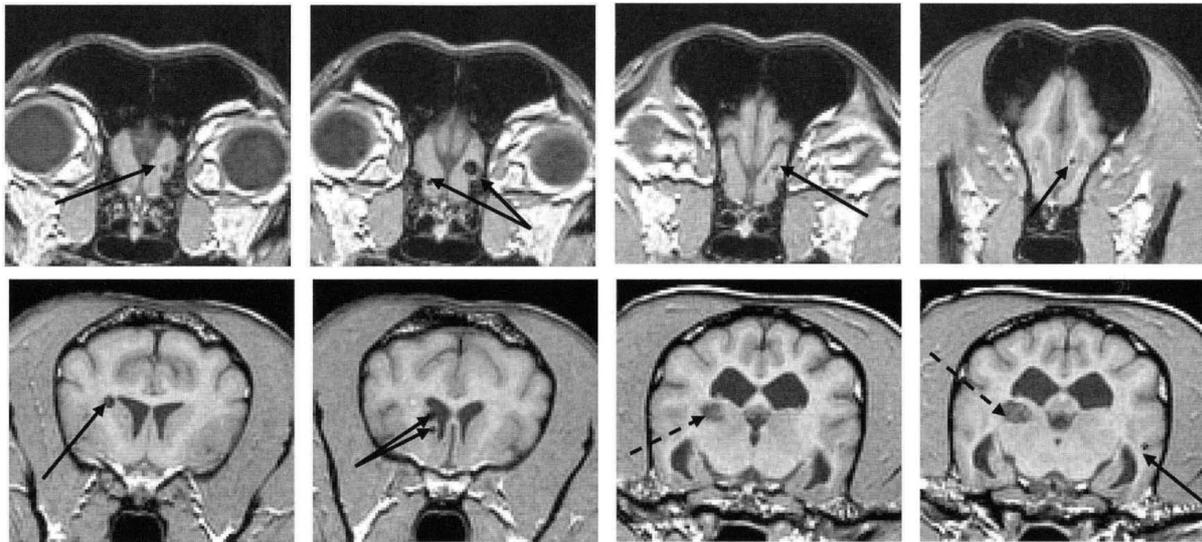


Figura 2. Imagens de ressonância magnética, na sequência T1-weighted, demonstrando a presença de lesões cerebrais hipointensas em cães idosos: infartos lacunares (seta contínua) e grandes infartos (seta em traçados). Fonte: Tapp e Siwak (3).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversas alterações resultantes do processo de senilidade podem ser identificadas no parênquima encefálico de indivíduos caninos e humanos, tais como, a redução volumétrica tecidual, que está associada ao alargamento dos sulcos cerebrais, dilatação dos ventrículos laterais, diminuição da altura do hipocampo e alargamento dos cornos temporais. Alterações de densidade tomográfica ou de intensidade na ressonância magnética também podem ser identificadas, e geralmente estão relacionadas com origem isquêmica. Devido à divergência de resultados e à escassez de pesquisas sobre a senilidade nos animais, torna-se necessária a realização de mais pesquisas para a determinação de achados mais consistentes, tanto na medicina como na medicina veterinária.

REFERÊNCIAS

1. Beason-Held LL, Horwitz B. Aging brain. In: Ramachandran VS. Encyclopedia of the human brain. New York: Academic Press; 2002. p.43-57.
2. Mosier JE. Effect of ageing on body systems of the dog. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1989;19:1-12.
3. Tapp PD, Siwak CT. The canine model of human brain aging: cognition, behavior, and neuropathology. In: Conn PM. Handbook of models for human aging. New York: Academic Press; 2006. p.415-34.
4. Terry RD, DeTeresa R, Hansen LA. Neocortical cell counts in normal human adult aging. Ann Neurol. 1987;21:530-9.
5. Marnier L, Nyengaard JR, Tang Y, Pakkenberg B. Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. J Comp Neurol. 2003;462:144-52.

6. Kruggel F. MRI-based volumetry of head compartments: normative values of healthy adults. *Neuroimage*. 2006;30:1-11.
7. Ge Y, Grossman RI, Babb JS, Rabin ML, Mannon LJ, Kolson DL. Age-related total gray matter and white matter changes in normal adult brain. Part I: volumetric MR imaging analysis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002;23:1327-33.
8. Courchesne E, Chisum HJ, Townsend J, Cowles A, Covington J, Egaas B, et al. Normal brain development and aging: quantitative analysis at in vivo MR imaging in healthy volunteers. *Radiology*. 2000;216:672-82.
9. Good CD, Johnsrude IS, Ashburner J, Henson RN, Friston KJ, Frackowiak RS. A voxel-based morphometric study of aging in 465 normal adult human brains. *Neuroimage*. 2001;14:21-36.
10. Sandor T, Albert M, Stafford J, Kemper T. Symmetrical and asymmetrical changes in brain tissue with age as measured on CT scans. *Neurobiol Aging*. 1990;11:21-7.
11. Von Braunmühl A. Alterserkrankungen des zentralnervensystems. In: Lubarsch H, Henke F, Rossle R. *Handbuch der speziellen pathologischen anatomie and histologie*. Berlin: Springer-Verlag; 1957. p.337-539.
12. Resnick SM, Pham DL, Kraut MA, Zonderman AB, Davatzikos C. Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. *J Neurosci*. 2003;23:3295-301.
13. Petersen RC, Jack Jr CR, Xu YC, Waring, SC, O'Brien PC, Smith GE, et al. Memory and MRI-based hippocampal volumes in aging and AD. *Neurology*. 2000;54:581-7.
14. Borràs D, Ferrer I, Pumarola M. Age-related changes in the brain of the dog. *Vet Pathol*. 1999;36:202-11.
15. Esiri MM, Hyman BT, Beyreuther K, Masters CL. Aging and dementia. In: Graham DI, Lantos PL. *Greenfield's neuropathology*. 6^a ed. London: Arnold; 1997. p.153-213.
16. Uchida K, Nakayama H, Goto N. Pathological studies on cerebral amyloid angiopathy, senile plaques and amyloide deposition in visceral organs in aged dogs. *J Vet Med Sci*. 1991;53:1037-42.
17. Head E. Brain aging in dogs: parallels with human brain aging and Alzheimer's disease. *Vet Ther*. 2001;2:247-60.
18. Head E, McCleary R, Hahn FF, Milgram NW, Cotman CW. Region-specific age at onset of beta-amyloid in dogs. *Neurobiol Aging*. 2000;21:89-96.
19. Colle M-A, Hauw J-J, Crespeau F, Uchihara T, Akiyama H, Checler F, et al. Vascular and parenchymal A β deposition in the aging dog: correlation with behavior. *Neurobiol Aging*. 2000;21:695-704.
20. Prior R, D'Urso DE, Frank R, Prikulis I, Pavlakovic G. Loss of vessel wall viability in cerebral amyloid angiopathy. *Neuroreport*. 1996;7:562-4.

21. Su M-Y, Head E, Brooks WM, Wang Z, Muggenburg B, Adam GE, et al. Magnetic resonance imaging of anatomic and vascular characteristics in a canine model of human aging. *Neurobiol Aging*. 1998;19:479-85.
22. Scahill RI, Frost C, Jenkins R, Whitwell JL, Rossor MN, Fox NC. A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging. *Arch Neurol*. 2003;60:989-94.
23. Pugliese M, Carrasco JP, Gomez-Anson B, Andrade C, Zamora A, Rodríguez MJ, et al. Magnetic resonance imaging of cerebral involucional changes in dogs as markers of aging: an innovative tool adapted from a human visual rating scale. *Vet J*. 2010;186:166-71.
24. Szentkuti A, Guderian S, Schiltz K, Kaufmann J, Münte TF, Heinze HJ, et al. Quantitative MR analyses of the hippocampus: unspecific metabolic changes in aging. *J Neurol*. 2004;251:1345-53.
25. Pfefferbaum A, Sullivan EV, Jernigan TL, Zipursky RB, Rosenbloom MJ, Yesavage JA, et al. A quantitative analysis of CT and cognitive measures in normal aging and Alzheimer's disease. *Psychiatry Res*. 1990;35:115-36.
26. Jernigan TL, Archibald SL, Fennema-Notestine C, Gamst AC, Stout JC, Bonner J, et al. Effects of age on tissues and regions of the cerebrum and cerebellum. *Neurobiol Aging*. 2001;22:581-94.
27. Walhovd KB, Fjell AM, Reinvang I, Lundervold A, Dale AM, Eilertsen DE, et al. Effects of age on volumes of cortex, white matter and subcortical structures. *Neurobiol Aging*. 2005;26:1261-70.
28. Luft AR, Skalej M, Schulz JB, Welte D, Kolb R, Bürk K, et al. Patterns of age-related shrinkage in cerebellum and brainstem observed in vivo using three-dimensional MRI volumetry. *Cereb Cortex*. 1999;9:712-21.
29. Matsumae M, Kikinis R, Mórocz IA, Lorenzo AV, Sándor T, Albert MS, et al. Age-related changes in intracranial compartment volumes in normal adults assessed by magnetic resonance imaging. *J Neurosurg*. 1996;84:982-91.
30. Wanifuchi H, Shimizu T, Maruyama T. Age-related changes in the proportion of intracranial cerebrospinal fluid space measured using volumetric computerized tomography scanning. *J Neurosurg*. 2002;97:607-10.
31. Su M-Y, Tapp PD, Vu L, Chen Y-F, Chu Y, Muggenburg B, et al. A longitudinal study of brain morphometrics using serial magnetic resonance imaging analysis in a canine model of aging. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr*. 2005;29:389-97.
32. LeMay M. Radiologic changes of the aging brain and skull. *Am J Roentgenol*. 1984;143:383-9.
33. González-Soriano J, García M, Contreras-Rodriguez J, Martínez-Saintz P, Rodríguez-Veiga E. Age-related changes in the ventricular system of the dog brain. *Ann Anat*. 2001;183:283-91.

34. Meyer JS, Takashima S, Terayama Y, Obara K, Muramatsu K, Weather S. CT changes associated with normal aging of the human brain. *J Neurol Sci.* 1994;123:200-8.
35. Masliah E, Mallory M, Hanson L, DeTeresa R, Terry RD. Quantitative synaptic alteration in the human neocortex during normal aging. *Neurology.* 1993;43:192-7.
36. Terayama Y, Meyer JS, Takashima S, Obara K, Weathers S. Comparisons of polio-araiosis and leuko-araiosis in dementias of ischemic vascular and Alzheimer types. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 1993;3:267-75.
37. Meyer JS, Kawamura J, Terayama Y. White matter lesions in the elderly. *J Neurol Sci.* 1992;110:1-7.
38. Awad IA, Spetzler RF, Hodak CA, Awad CA, Carey R. Incidental subcortical lesions identified on magnetic resonance imaging in the elderly. I. Correlation with age and cerebrovascular risk factors. *Stroke.* 1986;17:1084-9.
39. Fuster JM. Frontal lobe and cognitive development. *J Neurocytol.* 2002;31:319-33.

Recebido em: 20/08/12

Aceito em: 25/02/13

CONTRIBUIÇÃO DO MÉTODO ULTRASSONOGRÁFICO NO DIAGNÓSTICO DE PIONEFROSE EM UM CANINO

Viviam Rocco Babicsak¹
Débora Rodrigues dos Santos¹
Karen Maciel Zardo¹
Alexandra Frey Belotta¹
Hugo Salvador Oliveira¹
Maria Jaqueline Mamprim²
Luiz Carlos Vulcano²
Vivian Lima De Souza³
Leonardo Delatorre Kairalla³
Claúdia Valéria Seullner Brandão⁴

RESUMO

O acúmulo de material purulento no interior da pelve renal dilatada constitui a pionefrose. O reconhecimento e tratamento precoce dessa doença são elementos fundamentais na evolução favorável do paciente. A ultrassonografia é considerada um método primordial no auxílio à determinação do diagnóstico. Neste relato descrevemos os achados ultrassonográficos encontrados em um canino com pionefrose.

Palavras-chave: ultrassonografia, pionefrose, canino.

CONTRIBUTION OF THE ULTRASONOGRAPHIC METHOD IN THE DIAGNOSTIC OF PYONEPHROSIS IN A CANINE

ABSTRACT

The accumulation of purulent material within the dilated renal pelvis characterizes pyonephrosis. The early recognition and treatment of this disease are essential elements in the favorable evolution of the patient. Ultrasound is considered a primordial method in the aid to the diagnostic determination. In this report we describe the sonographic findings found in a canine with pyonephrosis.

Keywords: ultrasonography, pyonephrosis, canine.

CONTRIBUCIÓN DEL MÉTODO ECOGRÁFICO EN EL DIAGNÓSTICO DE PIONEFROSIS EN CANINO

RESUMEN

La acumulación de material purulento dentro de la pelvis renal dilatada caracteriza la pionefrosis. El reconocimiento y tratamiento precoz de esta enfermedad son elementos esenciales en la evolución favorable del paciente. La ecografía es considerada un método

¹ Pós-graduando do setor de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP/Botucatu, SP, Brasil

² Docente do setor de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP/Botucatu, SP, Brasil

³ Pós-graduando do setor de Cirurgia de Pequenos Animais do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária – FMVZ – UNESP/Botucatu, SP, Brasil

⁴ Docente do setor de Cirurgia de Pequenos Animais do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária – FMVZ – UNESP/Botucatu, SP, Brasil

primario en el auxilio de la determinación del diagnóstico. En este informe se describen los hallazgos ecográficos en un canino con pionefrosis.

Palabras clave: ecografía, pionefrosis, canino.

INTRODUÇÃO

A pionefrose se caracteriza por um acúmulo de células inflamatórias e epitélio renal no interior do sistema coletor renal dilatado (1). Esta doença pode ser originada a partir de uma hidronefrose em associação a uma infecção ascendente secundária, de uma pielonefrite em conjunto com uma obstrução urinária (2) ou ainda por disseminação bacteriana via hematogênica (3).

Indivíduos de raças pequenas são geralmente os mais acometidos por pionefrose, entretanto, a verificação dessa característica não pode ser levada em conta na determinação desta afecção uma vez que a hidronefrose, doença classificada como o principal diagnóstico diferencial, também afeta, com uma maior frequência, animais de raças pequenas (2).

Com relação à idade dos animais acometidos por pionefrose, esta é considerada menor em comparação daqueles afetados por hidronefrose. A idade média dos indivíduos com pionefrose é de 7,6 anos, enquanto que, nos casos de hidronefrose, a idade média é de 9,1 anos (2).

O exame clínico de indivíduos humanos acometidos por essa afecção geralmente revela a presença de massa abdominal e hipertermia (4), no entanto, algumas vezes, os pacientes podem ser considerados assintomáticos (3). Anormalidades como piúria e hematuria também podem ser encontradas em humanos com pionefrose. Com relação aos exames laboratoriais, podem ser detectados aumento na concentração de enzimas renais (uréia e creatinina) e leucocitose por neutrofilia (4).

O diagnóstico geralmente é realizado a partir dos achados clínicos e ultrassonográficos (1). O diagnóstico dessa afecção e o diferencial para hidronefrose devem ser realizados precocemente para que assim haja a possibilidade de se evitar sérias complicações como destruição renal, choque séptico (5), abscessos renais e perinéfricos (6).

O objetivo desse relato de caso é descrever a contribuição da ultrassonografia na determinação do diagnóstico da pionefrose em um canino.

RELATO DE CASO

O animal do presente relato de caso refere-se a um canino sem raça definida, porte médio, com três anos de idade, apresentando acentuado abaulamento abdominal e sensibilidade dolorosa à palpação. No exame ultrassonográfico abdominal do paciente observou-se líquido livre e uma estrutura com paredes definidas (0,31 centímetros de espessura) e irregulares, devido à existência de prolongamentos teciduais com discreta formação de sombra acústica posterior (mineralização), para o interior da mesma (Figura 1). A estrutura que ocupava quase a totalidade do abdômen, apresentou um conteúdo altamente ecogênico (Figura 2), sem sinais de vascularização ao recurso Doppler colorido, sugerindo se tratar de uma coleção líquida com acentuada celularidade. Em região abdominal média, lateralmente a direita, não foi visibilizada nenhuma estrutura com arquitetura renal habitual. Esse fato associado à presença de uma estrutura com prolongamentos de parede para o interior da mesma (compatível com a imagem ultrassonográfica de divertículos renais) e a existência de conteúdo líquido em sua porção interna, indicaram que a estrutura abdominal se tratava do rim direito com acentuada dilatação de pelve e compressão do parênquima renal. Devido à presença de conteúdo altamente ecogênico em seu interior foi sugerida a existência de pionefrose. Posteriormente, o animal foi encaminhado para o setor de cirurgia de pequenos

animais, onde foi realizado o procedimento cirúrgico o qual confirmou a presença da renomegalia direita. Foi realizada a drenagem cirúrgica de aproximadamente 3 litros de conteúdo, que apresentava aspecto purulento e intensa degeneração celular à avaliação laboratorial, com o auxílio de um aspirador por se tratar de um fluido viscoso, a fim de facilitar a realização da nefrectomia, posteriormente. O animal foi acompanhado por dois meses após a excisão cirúrgica renal, sem nenhuma alteração clínica, laboratorial e ultrassonográfica identificada.

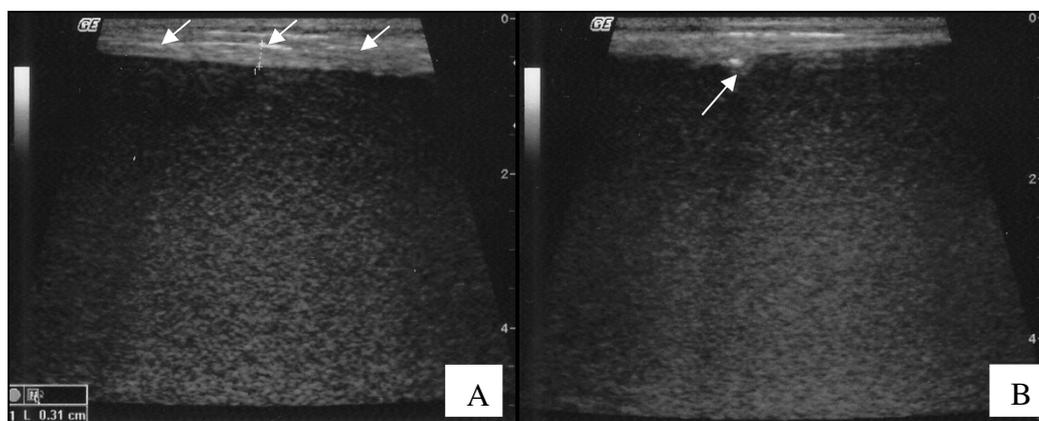


Figura 1. Imagem ultrassonográfica ilustrando o fino tecido circundando a estrutura (setas) (A) e uma projeção tecidual com discreta formação de sombra acústica posterior, originando-se para o interior da pelve a partir da parede (seta) (B).

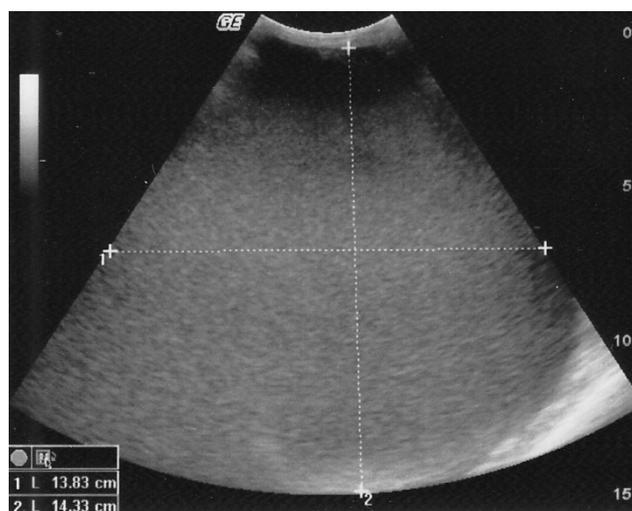


Figura 2. Imagem ultrassonográfica longitudinal ilustrando o conteúdo ecogênico da pelve renal direita, que mensurou pelo menos 13,83 cm de comprimento e 14,33 cm de largura.

DISCUSSÃO

A pionefrose, uma doença que acomete raramente animais (2), é representada por um acúmulo de conteúdo purulento na pelve renal. O diagnóstico dessa doença é baseado nos achados clínicos e na ultrassonografia (1), e deve ser realizado da forma mais precoce possível, uma vez que a rápida intervenção e instituição do tratamento são de extrema importância a fim de se evitar complicações (5).

O método imagiológico mais utilizado no auxílio à determinação do diagnóstico de pionefrose é o exame ultrassonográfico (1), uma vez que possibilita a avaliação do grau de dilatação da pelve renal e da compressão do parênquima renal. A forma severa dessa afecção

é a mais difícil de ser diagnosticada, uma vez que nesses casos não é possível a observação do córtex renal devido à acentuada compressão. Nesse grau de dilatação, é possível somente a visualização de uma fina porção do tecido na periferia do órgão, além de algumas imagens lineares hiperecogênicas originadas do tecido renal se projetando para o interior da estrutura (divertículos), assim como observado no animal deste relato de caso (7).

O exame ultrassonográfico também possibilita a avaliação da ecogenicidade do conteúdo presente na pelve renal. De acordo com a tabela elaborada por Coleman et al. (8) e modificada por Choi et al. (2) (tabela 1), o conteúdo pélvico do animal deste relato foi classificado como tipo 4, no qual há um preenchimento completo da pelve renal por um conteúdo ecogênico. Embora a presença de discretos ecos na pelve renal poder ser visualizada tanto em casos de pionefrose quanto em hidronefrose (9), um conteúdo do tipo 3, 4 ou 5 na pelve renal, sugere a existência de pionefrose, como ocorrido nesse caso (8).

Tabela 1. Classificação elaborada por Coleman et al. (8) e modificada por Choi et al. (2) baseada no aspecto ultrassonográfico do conteúdo pélvico renal.

Classificação	Aspecto ultrassonográfico da pelve renal
1	Conteúdo anecogênico
2	Conteúdo anecogênico associado à presença de alguns pontos ecogênicos flutuantes
3	Conteúdo anecogênico com diversos debrís ecogênicos na pelve renal (que deslocam-se com o reposicionamento do animal)
4	Conteúdo ecogênico (preenchimento completo)
5	Conteúdo intensamente ecogênico com formação de sombra acústica posterior (em decorrência da presença de conteúdo gasoso no interior da pelve renal)

O conteúdo ecogênico do animal aqui relatado apresentou indicações de alta viscosidade uma vez que não foi observada movimentação dos debrís ecogênicos (10), o que dificultou a determinação da natureza do mesmo. Um recurso complementar que auxiliou nessa caracterização foi a avaliação em modo Doppler colorido, o qual demonstrou não haver sinais de vascularização, diferenciando a coleção líquida de uma possível massa, como o carcinoma de células transicionais, que pode ser erroneamente sugerido em casos de presença de conteúdo do tipo 4 na pelve renal (8).

A ultrassonografia também pode ser utilizada para a avaliação de outras alterações que frequentemente são encontradas em conjunto à pionefrose como a presença de inflamação e fluido peritoneal e retroperitoneal, que podem ser originados a partir da exsudação do rim acometido (2). No estudo realizado por Choi et al. (2), a inflamação e fluido perinéficos foram observados em 11 de 18 cães (61,11%). No entanto, em humanos esses achados são raramente encontrados, podendo estar relacionado a um menor período de evolução da pionefrose até a determinação do diagnóstico em comparação aos caninos. Na ultrassonografia do animal deste caso foi observada uma discreta coleção de líquido livre abdominal, no entanto, durante o procedimento cirúrgico não foi observada inflamação peritoneal e retroperitoneal. Dessa forma, acredita-se que o fluido foi originado por compressão de vias linfáticas devido à extensa dimensão renal. Apesar do tempo longo de evolução do crescimento abdominal, suspeita-se que a infecção tenha ocorrido tardiamente uma vez que não foram observadas alterações inflamatórias perinéficas ou retroperitoneais.

A ultrassonografia também permite a realização da punção e drenagem pélvica renal de modo percutâneo, sendo útil tanto para o diagnóstico quanto para o tratamento desta afecção, sem a necessidade de anestesia dos animais, que pode se constituir em risco para os pacientes, que geralmente não se encontram em um bom estado geral. No procedimento de punção ou drenagem, pela orientação da ultrassonografia, uma agulha hipodérmica ou um cateter é inserido na pelve renal, ultrapassando a porção mais espessa do parênquima a fim de se evitar

extravasamento do conteúdo (11). A punção pélvica percutânea sob orientação da ultrassonografia não foi realizada no paciente aqui relatado devido a existência de apenas um fino tecido renal circundando o conteúdo, o que poderia resultar em extravasamento do fluido. Devido à acentuada extensão das dimensões renais e a inexistência de tecido renal viável, a nefrectomia foi realizada.

CONCLUSÕES

Por possibilitar a visibilização da pelve renal e de outras possíveis alterações concomitantes, a ultrassonografia é considerada uma importante modalidade na identificação e avaliação da piodrose, e portanto, deve ser sempre realizada na suspeita dessa doença, cujo diagnóstico precoce constitui um fundamental elemento na prevenção de possíveis complicações.

REFERÊNCIAS

1. Subramanyam BA, Raghavendra BN, Bosniak MA, Lefleur AS, Rosen RJ, Horii SC. Sonography of pyonephrosis: a prospective study. *Am J Roentgenol.* 1983;140:991-3.
2. Choi J, Jang J, Choi H, Kim H, Yoon J. Ultrasonographic features of pyonephrosis in dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2010;51:548-53.
3. Lezin STM, Hofmann R, Stoller ML. Pyonephrosis: diagnosis and treatment. *Br J Urol.* 1992;70:360-3.
4. Vehmas T, Päivänsalo M, Taavitsainen M, Suramo I. Ultrasound in renal pyogenic infection. *Acta Radiol.* 1988;29:675-8.
5. Chan JHM, Tsui EYK, Luka SH, Fung SL, Cheung YK, Chan MSM, et al. MR diffusion-weighted imaging of kidney: differentiation between hydronephrosis and pyonephrosis. *Clin Imaging.* 2001;25:110-3.
6. Roberts JA. Pyelonephritis, cortical abscess, and perinephric abscess. *Urol Clin North Am.* 1986;13:637-45.
7. Nyland TG, Mattoon JS, Herrgesell EJ, Wisner ER. Trato urinário. In: Nyland TG, Mattoon JS. *Ultra-som diagnóstico em pequenos animais.* 4ª ed. São Paulo: Roca; 2004. p.166-75.
8. Coleman BG, Arger PH, Mulhern CB, Pollack HM, Banner MP. Pyonephrosis: sonography in the diagnosis and management. *Am J Roentgenol.* 1981;137:939-43.
9. Jeffrey RB, Laing FC, Wing VW, Hoddick W. Sensitivity of sonography in pyonephrosis: a reevaluation. *Am J Roentgenol.* 1985;144:71-3.
10. Hirsch JH, Rogers JV, Mack LA. Real-time sonography of pleural opacities. *Am J Roentgenol.* 1981;136:297-301.
11. Szatmári V, Ösi Z, Manczur F. Ultrasound-guided percutaneous drainage for treatment of pyonephrosis in two dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;218:1796-9.

Recebido em: 16/01/12

Aceito em: 04/09/12

SURTO DE MANNHEIMIOSE PNEUMÔNICA EM OVINOS NO SUL DO BRASIL

Luana D'Avila Farias¹
Fernando Lopes Leivas Leite²
Silvana Beutinger Marchioro³
Bernardo Garziera Gasperin¹
Felipe Libardoni⁴
Eduardo Kenji Masuda¹
Glaucia Denise Kommers⁵
Luiz Francisco Irigoyen⁵
Agueda Castagna de Vargas⁵

RESUMO

Este relato descreve surto de manheimiose pneumônica em rebanho ovino de criação extensiva no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Destacam-se os sinais clínicos, achados patológicos e bacteriológicos compatíveis com infecção do trato respiratório inferior em duas fêmeas prenhes mestiças (Ile de France X Texel) submetidas a necropsia. Os exames laboratoriais permitiram o diagnóstico definitivo de manheimiose pneumônica pela presença de *Mannheimia haemolytica* biotipo A, agente etiológico da doença. Foi ressaltada também a importância do teste de sensibilidade aos antimicrobianos como base para a instituição do tratamento dos demais animais acometidos no rebanho. Este é o primeiro relato de surto de infecção pulmonar por *M. haemolytica* em ovinos no Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: *Mannheimia haemolytica*, broncopneumonia, ovinos, região sul do Brasil.

OUTBREAK OF OVINE RESPIRATORY MANNHEIMIOSIS IN SOUTHERN BRAZIL**ABSTRACT**

This report describes an outbreak of respiratory manheimiosis in a herd of extensive breeding sheep in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. We report the clinical signs, bacteriological and pathological findings compatible with lower respiratory tract infection in two pregnant females crossbreed (Ile de France x Texel) subjected to necropsy. Laboratory tests allowed the definitive diagnosis of respiratory manheimiosis by the presence of *Mannheimia haemolytica* biotype A, the etiologic agent of disease. We also emphasize the importance of antimicrobial susceptibility testing as the basis to the establishment of therapy in other animals infected in the herd. This is the first report of an outbreak of pulmonary infection by *M. haemolytica* in sheep in Rio Grande do Sul.

Keywords: *Mannheimia haemolytica*, bronchopneumonia, ovine, southern Brazil.

BROTE DE MANNHEIMIOSIS NEUMÓNICAS EN OVINOS EN EL SUR DE BRASIL

¹ Doutorando do Programa de Pós-Graduação da Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

² Graduando do curso de Medicina Veterinária, (UFSM).

³ Doutorando do Centro de Biotecnologia Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

⁴ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, (UFSM).

⁵ Professor do Programa de Pós-Graduação da Medicina Veterinária (UFSM), Av. Roraima, Campus Universitário, prédio 44, sala 5137, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil .Fone: (55) 3220 8107, Fax: (55) 3220 8257. Autor para correspondência: agueda.vargas@gmail.com.

RESUMEN

Este reporte describe un brote de manheimiosis néumonica en un rebaño de ovinos criados bajo régimen extensivo en el estado de Rio Grande do Sul, Brasil. Destacan los signos clínicos, resultados bacteriológicos y patológicos compatibles con infección respiratoria baja de dos ovejas mestizas gestantes (Ile de France x Texel). Los exámenes de laboratorio permiten el diagnóstico definitivo de manheimiosis neumónica provocada por *Mannheimia haemolytica* biotipo A, el agente etiológico de la enfermedad. También se hace hincapié en la importancia de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos como base para el inicio del tratamiento de otros animales afectados dentro del rebaño. Este es el primer reporte de un brote de la infección pulmonar por *M. haemolytica* en el ganado ovino en Río Grande do Sul.

Palabras clave: *Mannheimia haemolytica*, bronconeumonia, ovino, sur de Brasil

INTRODUÇÃO

Mannheimia haemolytica são bactérias gram-negativas que possuem como habitat a nasofaringe e tonsilas de ovinos saudáveis (1-2). Fatores predisponentes como mudanças no clima, ambiente e manejo podem desencadear a manheimiose pneumônica em ovinos (3). A forma pneumônica é uma das doenças respiratórias de maior significância para criatórios de ruminantes em todo o mundo, gerando grandes perdas econômicas (4).

Durante décadas o agente etiológico foi dividido em dois biotipos, A e T, agrupados em 17 sorotipos de acordo com propriedades bioquímicas e testes de hemaglutinação indireta (5, 6). No entanto, enquanto o biotipo A permanece alocado no gênero *Mannheimia*, o biotipo T foi reclassificado, considerado novo gênero denominado *Bibersteinia trehalosi* (7). Ambos os biotipos são isolados das pneumonias em ovinos, apesar de diferenças de ocorrências entre regiões (4). Fatores de virulência têm sido identificados em linhagens de *M. haemolytica*, como a endotoxina capaz de alterar a função dos leucócitos e a leucotoxina (LktA), considerada a mais patogênica entre os fatores de virulência, devido aos danos causados aos leucócitos no pulmão de animais infectados (1). Infecções pulmonares agudas causadas por essa bactéria são caracterizadas por resposta inflamatória fibrinossuprativa e necrótica, decorrente da liberação de toxinas de *M. haemolytica*, citocinas liberadas pelos neutrófilos e por outras células do processo inflamatório (8). No Brasil são escassos os dados sobre a ocorrência desta doença em ovinos. Em 2007, estudo realizado no estado de São Paulo verificou a presença de *M. haemolytica* na mesma proporção em ovinos sadios e portadores de afecção respiratória (3). Em 2009 foi descrito surto de pneumonia em ovinos no estado de Minas Gerais, no qual *M. haemolytica* foi identificada como agente etiológico (9).

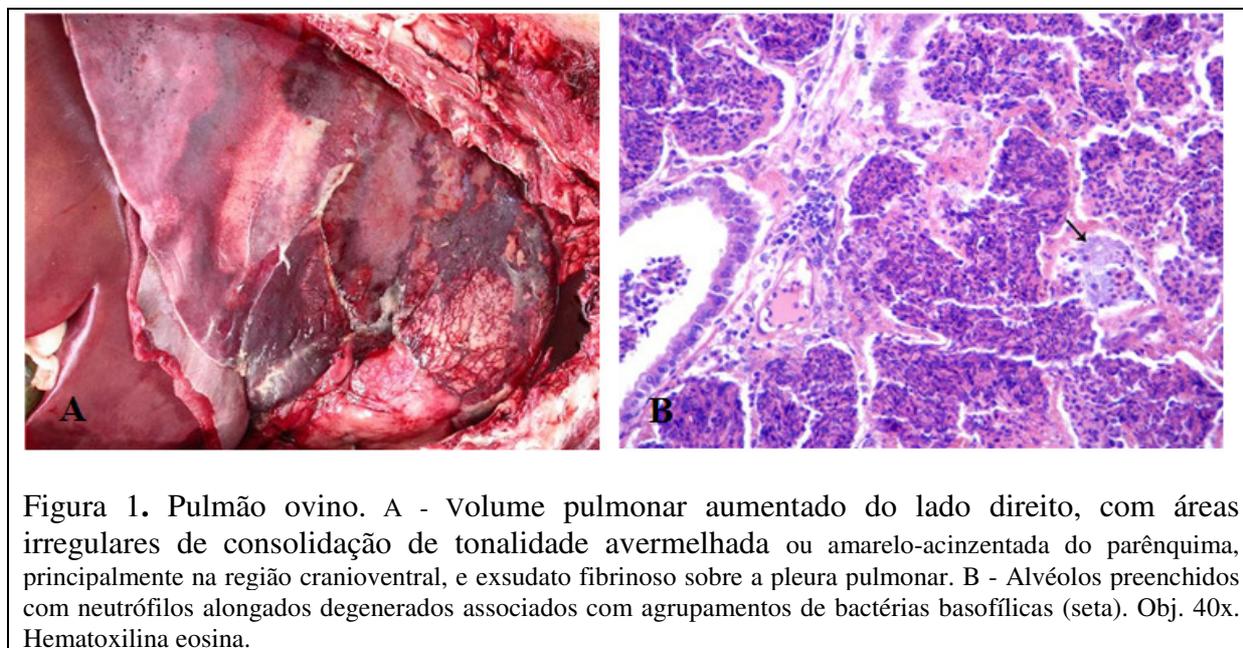
O presente relato tem como objetivo descrever os achados clínicos, patológicos e microbiológicos de surto de pneumonia em ovinos no Rio Grande do Sul, com ênfase no diagnóstico microbiológico, anatomopatológico e no perfil de sensibilidade aos antimicrobianos como respaldo ao trabalho.

RELATO DE CASO

Relata-se dois casos de morte súbita em duas ovelhas prenhes em um rebanho de mestiços Ile de France X Texel, composto por 96 ovinos criados extensivamente, situado na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. Exame clínico dos ovinos mostrou que os animais apresentavam-se apáticos, com tosse, dispnéia, secreção nasal mucopurulenta bilateral, hiperemia das narinas, salivação excessiva, mucosas congestas e diarreia.

Após a manifestação dos sinais clínicos, realizou-se a coleta da secreção nasal mucopurulenta com auxílio de suabe estéril, que foi encaminhado ao Laboratório de Bacteriologia para análise microbiológica. Após a morte do primeiro animal, este foi submetido à necropsia e fragmentos de pulmão também foram enviados para cultivo microbiológico. Uma semana após a morte do primeiro animal, ocorreu outro caso similar que também foi submetido à necropsia e análise microbiológica.

Na necropsia, as alterações macroscópicas e microscópicas pulmonares foram similares nos dois ovinos. Foi encontrada pequena quantidade de exsudato serofibrinoso na cavidade torácica. A pleura parietal mostrava coloração vermelho escuro, com fibrina e múltiplas áreas de adesão à pleura pulmonar. O pulmão apresentava aumento de volume, especialmente no lado direito, com áreas irregulares e de consolidação pulmonar de tonalidade avermelhada ou amarelo-acinzentada do parênquima na região cranioventral. Na superfície de corte, foi observado exsudato purulento nos brônquios e áreas vermelho-escuras firmes, intercaladas com áreas necróticas amareladas (Figura 1A). Microscopicamente, broncopneumonia fibrinosa difusa grave e necrossupurativa foram observadas. Em certas áreas os alvéolos estavam preenchidos com neutrófilos degenerados alongados, conhecidos como "células em grão de aveia", associados aos agregados cocobacilos basofílicos. Marcada pleurite fibrinosa difusa também foi observada (Figura 1B).



Amostras de secreção nasal e fragmentos de pulmão foram enviadas para o laboratório de bacteriologia e cultivadas em agar sangue acrescido de sangue ovino (5%) e MacConkey à 37°C por 48h. O micro-organismo foi classificado de acordo com as características de cultivo, morfo-tintoriais e bioquímicas (5) e submetido ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos (10). A linhagem isolada foi liofilizada e enviada à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para confirmação diagnóstica.

Os resultados dos ensaios microbiológicos confirmaram a presença de *Mannheimia haemolytica*, caracterizada pela FIOCRUZ como *M. haemolytica* biotipo A. No teste *in vitro* de sensibilidade aos antimicrobianos, o isolado foi sensível à penicilina, ampicilina, azitromicina, enrofloxacina, eritromicina, estreptomicina, florfenicol, gentamicina, sulfazotrin e tetraciclina. A morbidade da doença foi de 25% neste rebanho e os 22 novos casos clínicos foram tratados com tetraciclina intramuscular, na dose de 20 mg/Kg de peso vivo (PV) durante 5 dias, e apresentaram recuperação após o tratamento.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A manheimiose pneumônica causa sério impacto na ovinocultura (4). No entanto, são escassos os dados na literatura nacional envolvendo esta enfermidade. No Brasil, os estudos são pontuais, localizados principalmente na região sudeste. Araújo, Costa e Ecco (9) descreveram a doença em ovinos de Minas Gerais e Viana et al. (3) investigaram a ocorrência de *M. haemolytica* e *Pasteurella multocida* em ovinos sadios e doentes no estado de São Paulo.

No presente relato é enfatizada a necessidade do diagnóstico laboratorial para a correta identificação do agente etiológico e a realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos, que permite nortear a terapia. O resultado dos testes bioquímicos concordam com Janda e Mutters (5), sustentando que o gênero *Mannheimia* pode ser diferenciado fenotipicamente do gênero *Pasteurella* pela não fermentação da manose e do gênero *Haemophilus* por fermentar o manitol e das espécies de *Actinobacillus* por ser urease-negativa. A linhagem identificada foi classificada como biotipo A, considerando a produção de ácido a partir da L-arabinose e a falha na fermentação da trealose, conforme Janda e Mutters (5) e Lo (1). Embora Janda e Mutters (5) considerem o biotipo A associado aos bovinos e o biotipo T (*Bibersteinia trehalosi*) associado aos ovinos, Lo (1) ressaltou que *M. haemolytica* também causa doença pulmonar em ovinos.

No presente relato o tratamento foi realizado utilizando a tetraciclina, com base na sensibilidade do isolado mostrada no teste *in vitro* utilizando o método de difusão em ágar. Esse antimicrobiano também foi recomendado por Scott (11) e usado por Odugbo et al. (12) em surto da doença na Nigéria. A escolha do antimicrobiano respaldado pelo teste de sensibilidade aos antimicrobianos aumenta as taxas de cura e reduz os riscos de pressão de seleção de bactérias multirresistentes nos criatórios.

Relata-se pela primeira vez surto de manheimiose pneumônica em ovinos no Rio Grande do Sul, Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Lo RYC. Mannheimia. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4^o ed. Blackwell Publishing: Iowa; 2010. p.347-56.
2. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses. 10^o ed. Edinburgh: Saunders; 2007.
3. Viana L, Gonçalves RC, Oliveira JPF, Paes AC, Amorim RM. Ocorrência de Mannheimia haemolytica e Pasteurella multocida em ovinos sadios e com enfermidade respiratória. Arq Bras Med Vet Zootec. 2007;59:1579-82.
4. Mohamed RA, Abdelsalam EB. A review on pneumonic pasteurellosis (respiratory manheimiosis) with emphasis on pathogenesis, virulence mechanisms and predisposing factors. Bulg J Vet Med. 2008;11:139-60.
5. Janda WM, Mutters R. Pasteurella, Mannheimia, Actinobacillus, Eikenella, Kingella, Capnocytophaga, and other miscellaneous gram-negative rods. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G. Topley & Wilson's: microbiology and microbial infections – bacteriology. 10^o ed. Washington: Hodder Arnold; 2005. v.2.

6. Younan M, Fodor L. Characterization of a new *Pasteurella* serotype (A17). *Res Vet Sci.* 1995;58:98.
7. Blackall PJ, Bojesen AM, Christensen H, Bisgaard M. Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:666-74.
8. Yener Z, Ilhan F, Ilhan Z, Saglam YS. Immunohistochemical detection of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* antigens in goats with natural pneumonia. *Vet Res Commun.* 2009;33:305-13.
9. Araújo MR, Costa MC, Ecco R. Occurrence of pneumonia associated to infection by *Mannheimia haemolytica* in sheep of Minas Gerais. *Pesqui Vet Bras.* 2009;29:719-24.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighteenth informational supplement. M100-S18. Wayne: CLSI; 2008.
11. Scott PR. Treatment and control of respiratory disease in sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2011;27:175-86.
12. Odugbo MO, Okpara JO, Abechi SA, Kumbish PR. An outbreak of pneumonic pasteurellosis in sheep due to *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* serotype 7. *Vet J.* 2004;167:214-5.

Recebido em: 01/08/11

Aceito em: 02/10/12

GOTA ÚRICA VISCERAL EM TUCANO TOCO (*Ramphastos toco*)

Milena Pereira Coppola¹
João Carlos Zamae Rodrigues¹
Ana Angelita Sampaio Baptista²
Júlio Lopes Sequeira³
Raphael Lúcio Andreatti Filho⁴
Adriano Sakai Okamoto⁴

RESUMO

As aves são animais uricotélicos, ou seja, excretam o ácido úrico como produto final do metabolismo do nitrogênio, este que é oriundo da alimentação ou do catabolismo do tecido corporal. Considerada uma patologia metabólica, a gota úrica caracteriza-se pelo acúmulo anormal de cristais de ácido úrico em duas maneiras distintas: gota articular e gota visceral. Este trabalho relata um caso de gota úrica visceral em tucano toco (*Ramphastos toco*), diagnosticado por lesões macro e microscópicas.

Palavras-chave: ácido úrico, gota úrica, tucano toco.

VISCERAL GOUT URIC IN TOUCAN TOCO (*Ramphastos toco*)**ABSTRACT**

Birds are uricotelic animals, they excret uric acid as the chief component of nitrogen metabolism, which comes from the feeding or catabolism of corporal tissue. Considered a metabolic pathology, uric gout is characterized by the abnormal accumulation of uric acid crystals. Its occurrence is possible in two different ways: articular gout and visceral gout. This present work reports a case of visceral gout on toucan toco (*Ramphastos toco*), diagnosed by gross anatomy and histopathology.

Keywords: uric acid, gout uric, toco toucan

GOTA ÚRICA VISCERAL EN TUCÁN (*Ramphastos toco*)**RESUMEN**

Las aves son animales uricotélicos, es decir, que excretan el ácido úrico como producto final del metabolismo del nitrógeno que proviene de la alimentación o del catabolismo de los tejidos corporales. Considerada una patología metabólica, la gota úrica se caracteriza por la acumulación anormal de cristales de ácido úrico de dos maneras distintas: gota articular y gota visceral. Este trabajo reporta un caso de gota visceral en un tucán (*Ramphastos toco*), diagnosticada por lesiones macro y microscópicas.

Palabras claves: ácido úrico, gota úrica, tucán

¹ M. V. Residente, Depto. Clínica – Ornitopatologia – FMVZ, Botucatu/SP, Brasil

² Doutoranda, Depto. Clínica – Ornitopatologia – FMVZ, Botucatu/SP, Brasil

³ Prof. Dr., Depto. Clínica – Patologia – FMVZ, Botucatu/SP, Brasil

⁴ Prof. Dr., Depto. Clínica – Ornitopatologia – FMVZ, Botucatu/SP, Brasil

INTRODUÇÃO

Pertencente ao Gênero *Ramphastos*, a espécie *toco*, popularmente conhecida como tucano toco é uma ave insígnia da fauna Neotropical, que habita paisagens que vão desde matas de galeria até cerrado. Possuem uma dieta variada, constituída por frutas carnosas, sementes, pequenos artrópodes e neonatos de outras espécies aviárias (1). As aves excretam o ácido úrico, um metabólito nitrogenado derivado das purinas, proveniente do metabolismo de proteínas endógenas e exógenas (2). A demasiada quantidade de nitrogênio no organismo pode suscitar um acúmulo de ácido úrico em vários tecidos corpóreos, quando deveriam ser excretado pelos rins, fator que pode gerar hiperuricemia e gota úrica (3). A gota úrica caracteriza-se como uma patologia metabólica, uma vez que ocorre devido ao acúmulo anormal de cristais de ácido úrico nos tecidos viscerais e articulações. Geralmente esta condição está associada a fatores que reduzem a eliminação ou aumentam a produção do metabólito nitrogenado no organismo (4).

Esta doença pode manifestar-se nas aves de forma articular, quando os cristais de ácido úrico acumulam-se dentro da cápsula articular, ao seu redor ou em torno das bainhas tendíneas, ou então na forma visceral, que incide quando o nível plasmático de ácido úrico está elevado e, conseqüentemente, ocorre depósito de uratos no pericárdio, fígado, baço, rins entre outros órgãos (2). Os principais fatores predisponentes da gota são: dietas ricas em proteínas e cálcio, diminuição da circulação sanguínea, desidratação (5), deficiências nutricionais (hipervitaminose D e hipovitaminose A), nefropatias (infecções bacterianas e virais, insuficiência renal ou neoplasias), toxicoses (6), utilização de aminoglicosídeos, diclofenaco (7) e hereditariedade (5).

RELATO DE CASO

O tucano toco, encontrado em terreno abandonado na cidade de Botucatu, foi encaminhado pelo Corpo de Bombeiros para o Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres – CEMPAS – FMVZ, Botucatu. Segundo anamnese, o animal encontrava-se com dispnéia, discreta abertura de asas e, ao exame externo, não foi constatada fratura, lesão ou trauma. Apresentava escore corporal acima do comum para a espécie. Munícipes referiram-se à ave como sendo de proprietário local. Não foi realizado nenhum procedimento clínico ou oferta de medicamento, uma vez que o animal veio a óbito assim que chegou ao CEMPAS. Dessa forma, a ave foi encaminhada ao Laboratório de Ornitopatologia da UNESP - FMVZ – Botucatu, para necropsia e diagnóstico de *causa mortis*.

No decorrer da necropsia, notou-se intensa quantidade de gordura na cavidade celomática, como ilustra a figura-1, principalmente envolvendo ventrículo, mesentério e ovário. Este quadro pode ser oriundo de uma dieta incomum para espécie, uma vez que a ave possivelmente não era de vida livre, tendo acesso fácil ao alimento. As principais alterações macroscópicas observadas foram: intensa presença de material esbranquiçado, compatível com ácido úrico em saco aéreo e fígado (Fig.1-A). Observaram-se pontos esbranquiçados parecidos com “pó de giz” concentrados nas bordas dos sacos aéreos. Os órgãos afetados foram avaliados individualmente e coletados para exame histopatológico. Realizou-se punção do líquido pericárdico para análise citológica, uma vez que se suspeitou da presença de uratos dissolvidos devido à sua coloração esbranquiçada.

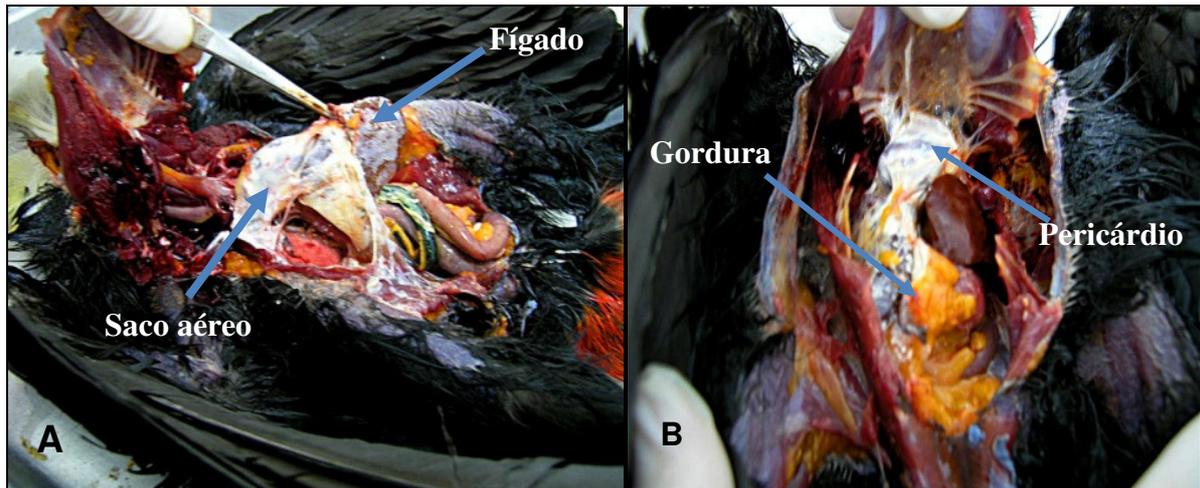


Figura 1. Achados macroscópicos: A - abertura da cavidade celomática com presença de ácido úrico em saco aéreo e fígado. B - gordura em mesentério intestinal e presença de ácido úrico em pericárdio.

Na análise histopatológica, foram observadas discretas alterações no coração, principalmente em miocárdio e em região ventricular, devido à presença de cristais de urato envoltos por um material basofílico. No fígado, verificou-se esteatose hepática e degeneração vacuolar. Os achados microscópicos compatíveis com a gota úrica foram observados claramente nos rins, que apresentaram degeneração tubular, caracterizada pela formação de vacúolos gordurosos nas células tubulares e presença de uratos na luz dos túbulos, descaracterização glomerular com diminuição do lúmen capilar e hialinização estrutural, bem como formação de cristais de urato (Fig.2).

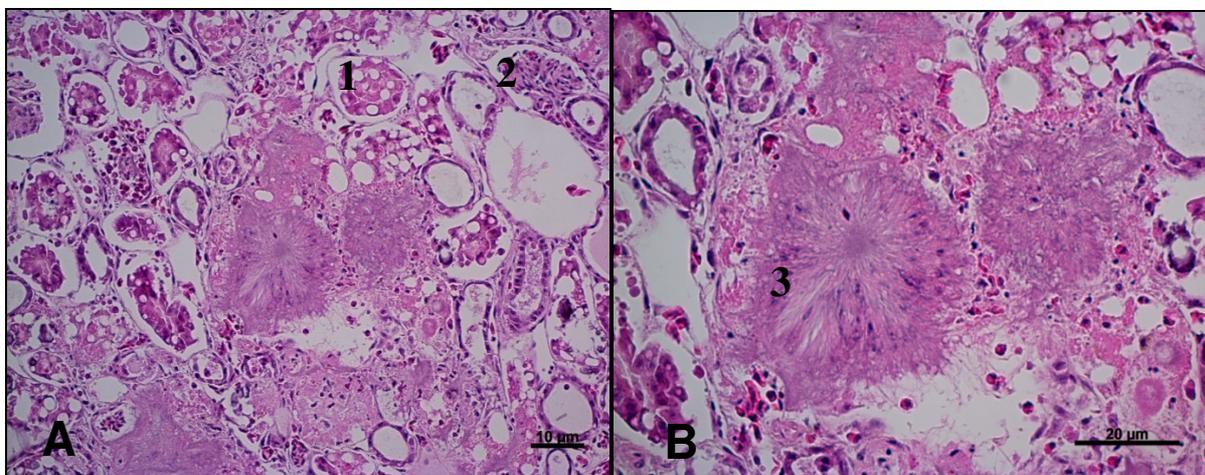


Figura 2. Histopatologia renal: A - degeneração tubular com formação de vacúolos de gordura (1) e glomérulos com estrutura modificada (2) – aumento de 10x, coloração HE. B - cristais de uratos (3) – aumento de 20x, coloração HE.

O exame citológico revelou grande quantidade de cristais de urato entrelaçados, análogos a malha de fibra de vidro, com pouca celularidade e calcificação, quando observado em uma porção mais densa da lâmina (Fig.3-A). Já em uma área menos densa, como ilustra a figura 3-B, notou-se presença de hemácias degeneradas e áreas de calcificação.

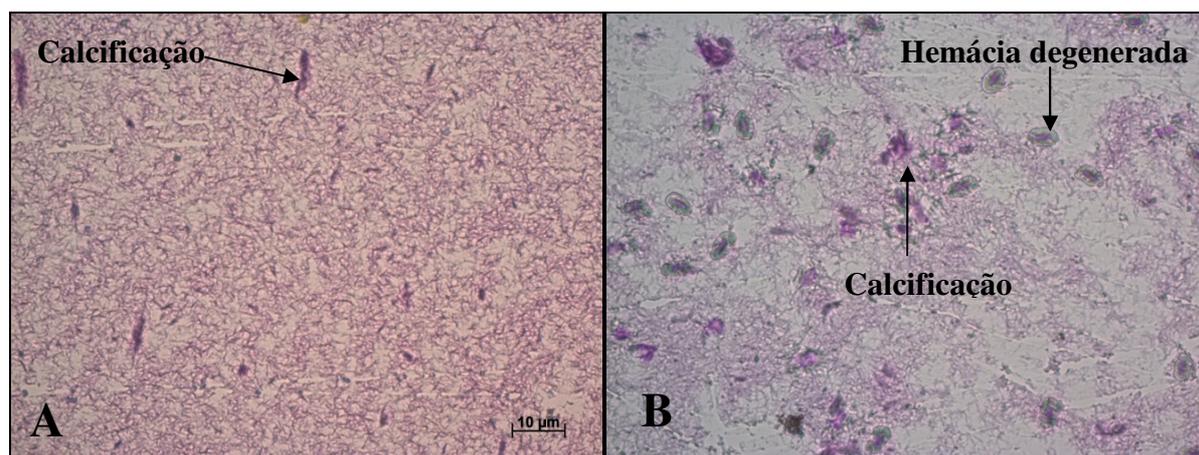


Figura 3. Citologia de líquido pericárdio: A – densa quantidade de cristais entrelaçados, ausência de celularidade e calcificação - aumento de 10x, coloração HE. B – cristais em menor quantidade e presença de hemácias em degeneração - aumento de 20 x, coloração HE.

CONCLUSÃO

Com os achados macroscópicos, juntamente com os resultados dos exames microscópicos, conclui-se que o processo principal encontrado no tucano toco foi um quadro característico de gota úrica visceral.

REFERENCIAS

1. Ragusa-Neto J. Abundance and frugivory of the Toco toucan (*Ramphastos toco*) in a gallery Forest in Brazil's Pantanal. *Braz J Biol.* 2006;66(1):133-42.
2. Echols MS. Evaluating and treating the kidneys. In: Harrison GH, Lightfoot TL, editors. *Clinical avian medicine.* Palm Beach (FL): Spix Publishing; 2006. p.451-91.
3. Ullrey DE, Allen ME, Baer DJ. Formulated diets versus seed mixtures for psittacines. *Nutrition of caged birds. J Nutr.* 1991;121(11):193S-205S.
4. Styles DK, Phalen DN. Clinical avian urology. *Semin Avian Exotic Pet Med.* 1998;7(2):104-13.
5. Angel R, Ballam G. Dietary protein effect on parakeet plasma uric acid, reproduction and growth. In: *Association of Avian Veterinarians Annual Conference Proceedings; 1995, Philadelphia.* Philadelphia: AAV; 1995. p.27-32.
6. Rupley AE. *Manual de clínica aviária.* São Paulo: Roca; 1999.
7. Oaks JL, Martin G, Rideout BA. Diagnostic investigation into vulture mortality, Punjab Province, Pakistan: Department of veterinary Microbiology and Pathology. Washington: State University; 2004.

Recebido em: 31/07/12
Aceito em: 13/11/12

***Geotrichum candidum* E SUA IMPORTÂNCIA NAS MASTITES**

Helio Langoni¹
Felipe Freitas Guimarães²
Guido Gomes Wanderley³
Anelise Salina⁴
Ubirajara Leony de Lavor⁵

RESUMO

Os patógenos isolados a partir da glândula mamária, independente da mastite, clínica ou subclínica, podem representar perigo à saúde do consumidor. Existem mastites contagiosas e ambientais, envolvendo um grande número de micro-organismos variando entre eles sua importância, tanto do ponto de vista epidemiológico como da patogenia. O presente relato demonstra a participação do *Geotrichum candidum* na etiologia das mastites e discute aspectos relacionados à sua ocorrência.

Palavras-chave: aspectos epidemiológicos, *Geotrichum candidum*, mastite subclínica, bovino.

Geotrichum candidum* AND THEIR IMPORTANCE IN MASTITIS*ABSTRACT**

Isolated pathogens from mammary glands, regardless the type of mastitis, subclinical or clinical, may be a hazard to consumer's health. There are contagious and environmental mastitis with the involvement of a large number of microorganisms varying the importance from the epidemiological view and pathogenesis. This report demonstrates the participation of *Geotrichum candidum* in the etiology of mastitis and discusses aspects related to the occurrence.

Keywords: epidemiological, *Geotrichum candidum*, subclinical mastitis, bovine.

Geotrichum candidum* Y SU IMPORTANCIA EN LA MASTITIS*RESUMEN**

Independientemente de la presencia de mastitis clínica o subclínica, los patógenos aislados de la glándula mamaria puede poner en peligro la salud de los consumidores. Existen mastitis contagiosas y ambientales, que involucran un gran número de microorganismos cuya importancia varía, tanto desde el punto de vista epidemiológico como de su patogenia. El presente informe demuestra la participación de *Geotrichum candidum* en la etiología de la mastitis y discute aspectos relacionados con su aparición.

Palabras clave: epidemiológica, *Geotrichum candidum*, mastitis subclínica, bovino.

¹ Professor Titular do Depto de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ UNESP/Botucatu

² Doutorando do Depto de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ UNESP/Botucatu

³ Residente da área de Zoonoses e Saúde Pública do Depto de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ UNESP/Botucatu

⁴ Bolsista de treinamento técnico do Depto de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ UNESP/Botucatu

⁵ Mestrando do Depto de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ UNESP/Botucatu

INTRODUÇÃO

Apesar da ampla variedade de micro-organismos isolados a partir da glândula mamária, há patógenos que, são predominantes, independente da idade do animal e tipo de mastite, quer seja subclínica ou clínica. Todos, entretanto, interferem na qualidade de leite, e alguns deles representam perigo à saúde do consumidor por se tratarem de agentes de zoonoses.

Do ponto de vista epidemiológico, considerando-se o micro-organismo causal, há mastites contagiosas e ambientais, sendo que no primeiro caso os agentes dependem do animal, como estafilococos, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma spp.* Os ambientais são encontrados no local de exploração dos animais como *Streptococcus uberis* e *dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, fungos, leveduras e algas, entre outros (1-3).

A ocorrência de casos esporádicos de mastites por micro-organismos de origem ambiental tem sido considerada como emergente, e as leveduras, fungos leveduriformes e os filamentosos são os principais agentes envolvidos. A maioria dos casos ocorre sob a forma de surtos localizados, muitas vezes relacionados com o tratamento com antimicrobianos por período de tempo prolongado. Os principais gêneros são *Candida* e *Cryptococcus*, além de *Geotrichum*, *Pichia* e *Trichosporum* (4).

As leveduras são consideradas saprófitas, tendo sido isoladas de tanques de armazenamento de leite (5). Apesar deste fato podem estar presentes em amostras de leite oriundas de animais com mastite (6-10).

O estudo etiológico de mastite bovina conduzido por Costa et al. (6) revelou o envolvimento de leveduras em 3,65% das amostras positivas à prova do Tamis, de uma grande amostragem pesquisada em 3.574 vacas em diferentes estágios de lactação provenientes de 28 propriedades. O isolamento de *Geotrichum candidum* foi obtido em 1,09% e 1,51% dos casos subclínicos e clínicos entre as 7902 e 850 amostras de leite examinadas respectivamente (8). A sua presença também foi relatada por Verma, Karla e Bhargava (11) entre outros patógenos isolados de casos de mastite subclínica e clínica, da mesma forma que Langoni et al. (12).

Entre outras leveduras, Bourtzi-Hatzopoulou et al. (13) verificaram a participação de *Geotrichum candidum* na mastite bovina, a partir de seu isolamento em casos clínicos da doença. Estudando a presença de leveduras e outros fungos leveduriformes em casos de mastite, Spanamberg et al. (4), isolaram diferentes espécies em 5,8% de 248 amostras proveniente de propriedades de Passo Fundo no Estado de Rio Grande do Sul.

Estudo conduzido por Elango e Doraisamy (14) mostrou o isolamento de *Geotrichum candidum* em 3,7% dos 27 (10,39%) casos positivos de mastite por leveduras entre as 261 amostras de leite com mastite clínica examinadas. Nota-se que apesar dos resultados variáveis quanto a participação deste patógeno nas mastites, este fato deve ser levado em consideração, pois vacas positivas podem servir como fontes de infecção para outros animais.

Considerando-se a múltipla etiologia nas mastites e a importância do exame microbiológico para o diagnóstico preciso de cada caso, para avaliação dos aspectos epidemiológicos com relação aos fatores de risco em cada propriedade, também como para o tratamento correto, está se apresentando o presente relato.

RELATO DO CASO

Durante visita técnica em fazenda leiteira localizada no município de São Pedro, SP-Brasil, para monitoramento da qualidade do leite, após a realização de procedimentos para higienização e antissepsia, colheu-se amostras de leite de todos os tetos de vacas positivas com escore +++ ao CMT de 330 animais, perfazendo 119 amostras de leite. De um caso de mastite subclínica isolou-se em meio ágar sangue ovino 8% em 48 horas, em estado puro e

exuberante, colônias de coloração branco acinzentadas, úmidas (Figura 1) e crescimento em ágar MacConkey (Figura 2). Microscopicamente ao Gram o micélio era septado e alguns fragmentados dentro de artrósporos retangulares (artroconidea) (Figura 3). A caracterização bioquímica foi realizada de acordo com Koneman et al. (15) sendo caracterizada como *Geotrichum candidum*. Trinta dias após obteve-se nova amostra de leite do mesmo teto, de onde o micro-organismo foi reisolado também em estado puro, revelando o estado de portador do animal, e de mastite crônica.



Figura 1. *Geotrichum candidum* em cultura de ágar sangue ovino 8%, mostrando colônias branco-acinzentadas, úmidas, elevadas, 48 horas de incubação. Fonte: Núcleo de Pesquisa em Mastite (NUPEMAS-FMVZ, UNESP, Botucatu, São Paulo).



Figura 2. *Geotrichum candidum*, em ágar MacConkey, 48 horas de incubação. Fonte: Núcleo de Pesquisa em Mastite (NUPEMAS-FMVZ, UNESP, Botucatu, São Paulo).

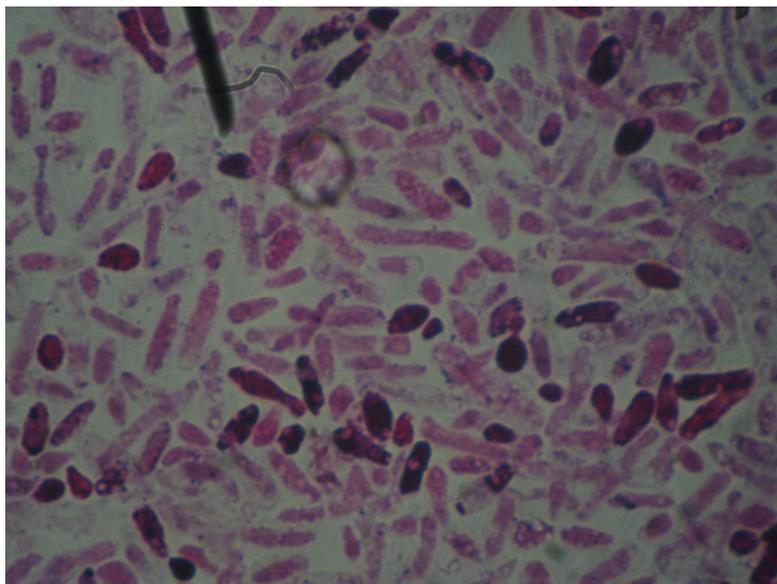


Figura 3. *Geotrichum candidum* apresentando micélios, artrósporos retangulares, Gram-positivo, note-se que alguns artrósporos estão dispostos em forma bulbosa, característicos dos fungos leveduriforme. Fonte: Núcleo de Pesquisa em Mastite (NUPEMAS-FMVZ, UNESP, Botucatu, São Paulo).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

De acordo com a literatura, há uma microbiota leveduriforme independente do estado sanitário do úbere, e se houver fatores predisponentes, como o uso indiscriminado de antimicrobianos, imunossupressão ou lesões no parênquima mamário, ocorrem alterações na microbiota ocasionando processo inflamatório como resposta natural do tecido (16). Os agentes envolvidos na mastite micótica são considerados como ambientais, uma vez que vivem no ambiente de criação dos animais, na pele dos tetos, mãos de ordenhadores e em vários substratos orgânicos (17). Pode ocorrer sob a forma de surtos ou como casos isolados tanto na forma clínica como subclínica (12)

Geotrichum candidum é uma levedura, queratinofílica, oportunista amplamente distribuída na natureza, como no solo e forragem, entre outros locais, entretanto pode ocasionar micose em animais e nos humanos (18). Há poucos relatos incriminando este patógeno como agente de mastite bovina, entretanto, apesar de com baixa ocorrência está entre os micro-organismos causadores de mastites subclínicas e clínicas (4, 6, 8, 11-14).

Samborski et al. (19), na Polônia, isolaram *G. candidum* em 2,8% de placentas de vacas que abortaram. No entanto, existem apenas alguns relatos no mundo sobre sua incriminação na mastite clínica em bovinos e raros os achados de isolados na mastite subclínica. Mishra e Panda (20) encontraram apenas um caso de *G. candidum* dos 135 casos de mastite clínica estudados no Estado de Orissa, na Índia. Do mesmo modo, Costa et al. (6) detectaram apenas uma amostra de leite de mastite subclínica positiva para *G. candidum* entre um total de 2078 de amostras analisadas.

Pode-se concluir que o envolvimento de *G. candidum* nas mastites bovinas é raro, mas a sua presença não pode ser negligenciada, principalmente nos casos crônicos de mastites clínicas que não cedem aos tratamentos com antimicrobianos rotineiramente utilizados no tratamento das mastites, devendo-se lançar mão do cultivo microbiano para elucidação da etiologia e indicação de tratamento adequado, que considerando-se a cronicidade do processo

e a dificuldade de se encontrar formulações anti-mastíticas para o tratamento específico, o ideal é o descarte do animal.

REFERÊNCIAS

1. Langoni H, Corrêa CNM, Corrêa WM, Barros JA, Corrêa GN. Mastites bovinas por *Candida* e *Klebsiella*. Rev Bras Med Vet. 1985;7:203-4.
2. Costa EO. Importância da mastite na produção leiteira do país. Rev Educ Contin CRMV-SP. 1998;1:3-9.
3. Radostitis EM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Veterinary medicine. 9th ed. London: W.B. Saunders; 2000.
4. Spanemberg A, Wunder Jr EA, Pereira DIB, Argenta J, Sanches EMC, Valente P, et al. Diversity of yeasts from bovine mastitis in southern Brazil. Rev Iberoam Micol. 2009;25:154-6.
5. Peres MR, Yokaya E, Passarelli D, Cantario SC, Benettis NR, Melville PA. Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira. Arq Inst Biol. 2004;71:663-5.
6. Costa EO, Gandra CR, Pires MF, Coutinho SD, Castilho W, Teixeira CM. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the state of São Paulo, Brazil. Mycopathologia. 1993;124:13-7.
7. Kuo CC, Chang CH. Isolation of yeasts from mastitis milk of dairy cattle. J Chin Soc Vet Sci. 1993;19:221-7.
8. Langoni H, Domingues PF, Chi KD, Pardo RB, Silva AV, Cabral KG, et al. Participação de leveduras, algas e fungos na mastite bovina. Vet Zootec. 1998;10:89-98.
9. Chahota R, Katoch R, Mahajan A, Verma S. Clinical bovine mastites caused by *Geotrichum candidum*. Vet Arh. 2001;71:197-201.
10. Victoria C, Langoni H. Occurrence of clinical and subclinical mastitis in dairy herd caused by *Trichosporon beigelli*. Braz J Vet Res Anim Sci. 2006;43:280-2.
11. Verma PC, Karla DS, Bhargava DN. Some aspects of histochemical studies in experimentally produced mycotic mastitis. Haryana Vet. 1985;14:27-34.
12. Langoni H, Domingues PF, Pinto MP, Listoni FJP. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. Arq Bras Med Vet Zootec. 1991;43:507-15.
13. Bourtzi-Hatzopoulou E, Zdragas A, Petridou E, Filioussis G. Yeasts as a causing agent of bovine mastitis in Greece. J Hell Vet Med Soc. 2003;54:105-10.
14. Elango A, Doraisamy K. Incidence of clinical mastitis caused by yeasts. Egypt J Dairy Sci. 2009;37:19-22.
15. Konemam EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

16. Luna CGS, Cervantes OR, Segundo ZC. Aislamiento e identificación de levaduras de leche de vacas clínicamente sanas o con mastitis clínica crónica. In: Anales del 6º Congreso Nacional de Control de Mastitis, Calidad de la Leche Y Producción Láctea y Anales del 1º Congreso Iberoamericano de Producción Animal; 2004, Guadalajara. Guadalajara, México: Asociación Iberoamericana de Médicos Veterinarios Especialistas en Producción Animal; 2004. p.201-10.
17. Richard JL, McDonald JS, Fitchner RE, Anderson AJ. Identification of yeasts from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. Am J Vet Res. 1980;48:1991-4.
18. Mutinelli FP, Gallo M, Dinati R. Systemic mycoses of the cat and the dog. Summa. 1986;3:213-9.
19. Samborski ZD, Szumigalska JA, Madej B, Sirlicka Z, Michalski A. Abortion in cow due to fungal infections of the reproductive tract. Med Wet. 1983;39:195-8.
20. Mishra PR, Panda SN. Some observations on the occurrence of mycotic mastitis in Orissa. Indian Vet J. 1986;63:886-888.

Recebido em: 16/08/12

Aceito em: 27/02/13

SÍNDROME VESTIBULAR PERIFÉRICA CONGÊNITA ASSOCIADA A MICROTIA EM CÃO

Mariana Isa Poci Palumbo¹
Jorge Piovesan Conti²
Maria Lúcia Gomes Lourenço³
Luiz Henrique de Araújo Machado³

RESUMO

Descreve-se o caso de um cão, sem raça definida, de 23 dias de idade com histórico de perda de equilíbrio e alteração anatômica em orelha externa. Ao exame físico observou-se o animal apresentava microtia do lado direito associada a inclinação da cabeça e tendência a andar em círculos para o lado direito. O cão atendido não apresentava otite externa evidente, dor à palpação das orelhas, nem histórico de meneios de cabeça, o que levou à exclusão, de forma presuntiva, da presença de um quadro inflamatório ou infeccioso em orelha média ou interna. Porém o animal apresentava microtia direita, possivelmente associada com a etiologia da síndrome vestibular periférica.

Palavras-chave: neurologia, neonatologia, cães.

CONGENITAL PERIPHERAL VESTIBULAR SYNDROME ASSOCIATED WITH MICROTIA IN A DOG

ABSTRACT

A mixed breed, 23 days old dog was presented due to loss of balance and a defect of the external ear. Right microtia, head tilt and walking in right circles were observed on clinical examination. History of headshaking, otitis externa, and pain on palpation of the ear were not present, leading to the presumptive exclusion of middle-inner ear disease of either inflammatory or infectious origin. However, the right microtia was probably associated with the etiology of the peripheral vestibular syndrome.

Keywords: neurology, neonatology, dogs.

SÍNDROME VESTIBULAR CONGÊNITA PERIFÉRICA RELACIONADA CON MICROTÍA EN EL PERRO

RESUMEN

Se describe el caso de un perro criollo de 23 días de edad con antecedentes de pérdida de equilibrio y deformidad de una de las orejas. En el examen clínico se observó microtía del pabellón auricular derecho, inclinación de la cabeza y tendencia a caminar en círculos en sentido del reloj. El perro no presentaba otitis externa evidente ni dolor a la palpación de las orejas. No existían antecedentes de movimientos involuntarios de la cabeza, lo que llevó a la exclusión presuntiva de un cuadro inflamatorio o infeccioso en el oído interno o medio. Sin

¹ Pós- graduanda do Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu

Endereço para correspondência: Av. Camilo Mazoni, 1055, Apto 42, Bloco G, CEP: 18610-285, Botucatu, São Paulo. E-mail: palumboma11@yahoo.com.br

² Médico Veterinário Autônomo

³ Prof. Ass. Dr. do Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP - Botucatu

embargo, la microtía de la oreja derecha posiblemente estaba asociada al síndrome vestibular periférico.

Palabras clave: neurología, neonatología, perros.

INTRODUÇÃO

O sistema vestibular é responsável por detectar a posição e o movimento do corpo no espaço pela integração da informação dos receptores periféricos localizados na orelha interna (1). Um funcionamento normal do sistema vestibular é essencial para coordenar as respostas motoras, movimentos oculares e a postura (2). A síndrome vestibular é comumente observada na prática clínica de pequenos animais (1) e resulta em uma síndrome clínica caracterizada por inclinação de cabeça, andar em círculos, rolamento, alteração de equilíbrio, nistagmo e estrabismo posicional (3-5). As possíveis etiologias para a síndrome vestibular periférica incluem: otite média-interna, neoplasias, pólipos, traumatismos, síndrome congênita, iatrogênica decorrente de limpeza ótica, hipotireoidismo, ototoxicidade por aminoglicosídeos e síndrome vestibular idiopática (5-7).

Existem relatos de síndrome vestibular congênita como malformação única, porém não foram encontrados relatos de síndrome vestibular periférica congênita associada à microtia em cães na revisão de literatura realizada. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é relatar a ocorrência de síndrome vestibular periférica congênita associada à microtia em um cão sem raça definida.

RELATO DE CASO

Foi atendido pelo Serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais da FMVZ - UNESP, campus de Botucatu, um cão sem raça definida de 23 dias de idade com histórico de perda de equilíbrio e microtia do lado direito (Figura 1A), observados desde os cinco dias de vida. As possibilidades de traumatismo, utilização de medicamentos ou realização de limpeza das orelhas foram excluídas pelo histórico.

Como o filhote era muito pequeno, não foi possível a realização da otoscopia, mas o conduto auditivo estava aberto. Todos os parâmetros vitais avaliados e o hemograma realizado encontravam-se dentro dos limites de normalidade. O exame neurológico revelou perda de equilíbrio, inclinação da cabeça para o lado direito, tendência a andar em círculos para o lado direito e estrabismo posicional do lado direito (Figura 1B). O nível de consciência e os demais nervos cranianos estavam normais para a idade do animal. As reações posturais e proprioceptivas estavam normais (saltitar, posicionamento visual e tátil, hemi-estação e hemilocomoção). Não foi possível avaliar os reflexos espinhais, pois o animal encontrava-se agitado e não permitia uma correta realização dos reflexos. A idade do animal dificultou a avaliação da audição, bem como a realização do potencial evocado auditivo de tronco encefálico. Uma segunda avaliação clínica foi agendada após o crescimento do filhote para melhor avaliação do exame neurológico e realização de exames radiográficos ou tomográficos da cabeça para verificação do aspecto das bulas timpânicas, conduto auditivo e pesquisa de hidrocefalia. Porém, o animal não regressou ao hospital veterinário, não sendo realizado o tratamento ou o acompanhamento da evolução do caso.

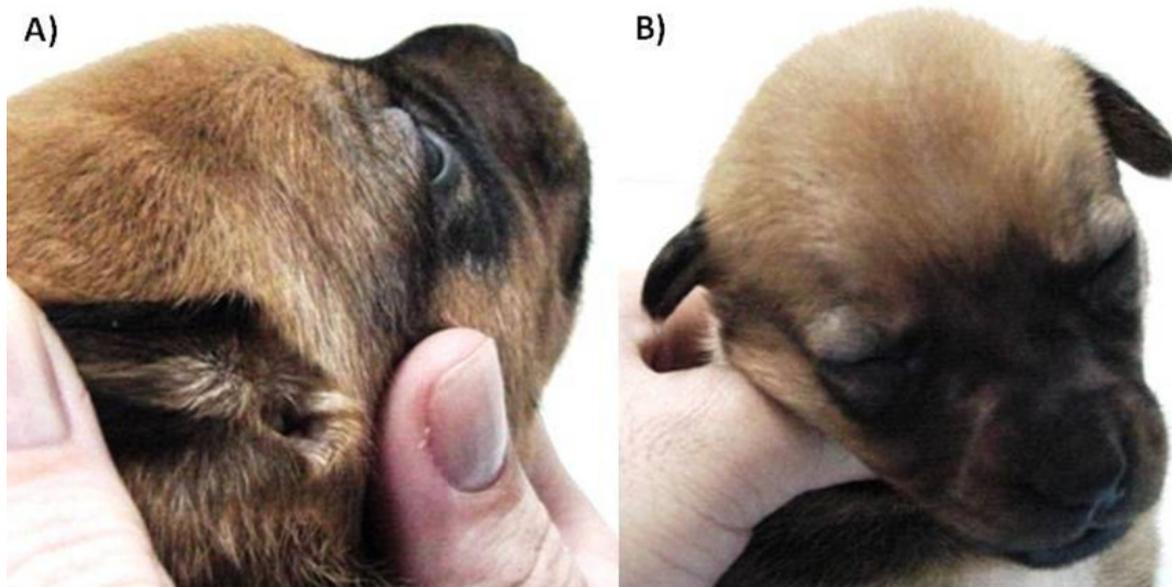


Figura 1. **A)** Pavilhão auricular externo direito pequeno; **B)** Animal com inclinação da cabeça para o lado direito e pavilhão auricular direito menor que o contralateral.

DISCUSSÃO

A síndrome vestibular é comumente observada na prática clínica de pequenos animais (1), porém a forma congênita ocorre raramente em cães e gatos, tendo sido descrita apenas em algumas raças, como: Dobermann Pinschers, Cocker Spaniels, Pastor Alemão, Akitas, Smooth Fox Terriers e Beagles (5), sendo este o primeiro relato em um cão sem raça definida. Apesar da literatura citar o início do aparecimento dos sinais entre três e 12 semanas (5, 6, 8), o animal avaliado já apresentava histórico de perda de equilíbrio desde os cinco dias de vida.

Os sinais clínicos do animal do presente relato eram compatíveis com lesão em sistema vestibular, caracterizada por inclinação de cabeça, quedas, rolamento, alteração de equilíbrio e andar em círculos para o mesmo lado da lesão (4, 5). O sinal clínico mais evidente foi a inclinação de cabeça, conforme descrito por De Lahunta (6). Não foi observada a presença de nistagmo, sinal que, segundo De Lahunta (6) e Muñana (5), não é característico da síndrome vestibular periférica congênita.

Os filhotes de até quatro a seis semanas de idade, tanto os caninos quanto os felinos, respondem de maneira diferente dos adultos ao exame neurológico, pelo fato do sistema nervoso ainda estar em desenvolvimento. Dentre os achados que podem orientar o clínico no diagnóstico de doença vestibular periférica incluem-se: alterações dos nervos cranianos, particularmente dos nervos facial e vestibulococlear, ausência de nistagmo vertical (pois só ocorre nas alterações centrais), nistagmo posicional, nível de consciência normal, ausência de disfunção cerebelar ou déficit proprioceptivo (9). O animal deste relato não apresentou nenhuma alteração compatível com lesão central, e o exame neurológico permitiu a localização da lesão em sistema vestibular periférico.

O cão não apresentava otite externa evidente, dor à palpação das orelhas, nem histórico de meneios de cabeça, o que levou à exclusão, de forma presuntiva, da presença de um quadro inflamatório ou infeccioso em orelha média ou interna. Porém, o animal apresentava microtia direita, possivelmente associada com a etiologia da síndrome vestibular observada.

Não existe tratamento específico para a síndrome vestibular periférica congênita (5). O prognóstico na maioria dos casos é bom, os sinais vestibulares geralmente regredem ou são compensados em dois a quatro meses de idade (5, 6), porém algum grau de inclinação da

cabeça pode persistir (1), acompanhado de deficiências auditivas permanentes (10). Acredita-se que qualquer compensação seja mediada pelo sistema nervoso central, possivelmente por meio de mecanismos visuais (9). Neste caso, o animal não retornou, e não foi possível acompanhar a evolução do caso.

A atresia do canal auditivo externo é raramente descrita (11, 12). Brodey e Harvey (13) descreveram a ocorrência de atresia do canal auditivo vertical em um cão sem sinais neurológicos, porém com otalgia. House (11) relatou a ocorrência de atresia do meato acústico externo distal em um cão com inclinação da cabeça e Simpson (14) em um cão sem sinais de vestibulopatia, sendo que nos dois relatos os animais apresentavam dor à palpação da região ventral da orelha. A atresia do conduto auditivo externo também já foi relatada em cão da raça Labrador Retriever (12). No presente caso não foi possível a realização de radiografias ou tomografia para melhor avaliação dos condutos auditivos para definição do tipo de malformação em orelha. A presença de hidrocefalia não foi descartada, pois o animal não voltou para a realização de exames complementares.

A fisiopatologia da síndrome vestibular periférica congênita é desconhecida (1, 5), e mais estudos são necessários para descrever melhor as alterações e a etiologia dessa síndrome congênita (3). A avaliação histológica revela ausência de lesões inflamatórias, degenerativas ou malformação no labirinto ou no sistema nervoso central (1, 6). Até onde é de nosso conhecimento, este é o primeiro relato de caso associando síndrome vestibular periférica congênita a malformação em orelha em um cão sem raça definida.

REFERÊNCIAS

- 1- Schunk KL. Disorders of the vestibular system. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1988;18:641-65.
- 2- Troxel MT, Drobatz KJ, Vite CH. Signs of neurologic dysfunction in dogs with central versus peripheral vestibular disease. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;227:579-4.
- 3- Chrisman CL. Vestibular diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1980;10: 103-29.
- 4- Moreau PM, Wheeler SJ. Neurological examination of the head. In: Wheeler SJ. *Manual of small animal neurology.* Shurdington: British Small Animal Veterinary Association; 1995. p.13-26.
- 5- Muñana KR. Head tilt and nystagmus. In: *Manual of canine and feline neurology.* Ames: Iowa State University Press; 2004. p.155-574.
- 6- De Lahunta A. Vestibular system-special proprioception. In: *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology.* Philadelphia: WB Saunders Company; 2009. p.319-47.
- 7- Chrisman C, Mariani C, Platt S, Clemmons R. Inclinação da cabeça, desequilíbrio e nistagmo. In: *Neurologia para o clínico de pequenos animais.* São Paulo: Roca; 2005. p.121-38.
- 8- Kornegay JM. Ataxia, head tilt, nystagmus: vestibular diseases. *Probl Vet Med.* 1991; 3:417-25.

- 9- Sanders SG, Babley RS. Distúrbios auditivos e de equilíbrio: nervo vestibulococlear e estruturas associadas. In: Dewey CW. Neurologia de cães e gatos - guia prático. São Paulo: Roca; 2006. p.123-39.
- 10- Forbes S, Cook JR. Congenital peripheral vestibular disease attributed to lymphocytic labyrinthitis in two related litters of Doberman Pinscher pups. J Am Vet Med Assoc. 1991;198:447-9.
- 11- House A. Atresia of the distal external acoustic meatus in a Bouvier des Flandres. J Small Anim Pract. 2001;42:88-9.
- 12- Schmidt K, Piaia T, Bertolini G, De Lorenzi D. External auditory canal atresia of probable congenital origin in a dog. J Small Anim Pract. 2007;48:233-6.
- 13- Brodey RS, Harvey CE. Atresia of the vertical ear canal in a dog. J Am Vet Med Assoc. 1969;1:1457-9.
- 14- Simpson D. Atresia of the external acoustic meatus in a dog. Aust Vet J. 1997;75:18-20.

Recebido em: 28/03/11

Aceito em: 05/03/13

USO DO ÁCIDO MEFENÂMICO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES EQUINOS

Tatiana Cabrera^{1,2}
José Antônio Dell'Aqua Junior³

RESUMO

Com o intuito de estender um aceitável intervalo entre a ovulação da receptora e dia da transferência de embrião (TE), o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido mefenâmico na capacidade de manutenção da função do corpo lúteo em receptoras que se encontravam no dia 10 do ciclo (D10), bem como verificar as taxas de prenhez após a transferência do embrião. Foram transferidos 48 embriões para receptoras no dia 10 do ciclo divididos em três grupos experimentais: Grupo 1 controle (n=18); Grupo 2 (n=15) receptoras tratadas com 1g de ácido mefenâmico por via oral desde o oitavo até o décimo sexto dia após a ovulação; Grupo 3 (n=15) receptoras tratadas com 1g de ácido mefenâmico por via oral no dia da transferência e por mais dois dias. Seis dias após a transferência dos embriões foi confirmada a gestação por ultrassonografia e repetida aos 30 dias. Para análise das porcentagens de gestação e classificação uterina no dia da TE foi utilizado o Teste de Fisher e para os valores obtidos da dosagem sérica de progesterona foi utilizado o teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey. O grupo controle apresentou 33,3% de taxa de gestação (6/18). Os grupos 2 e 3 apresentaram 40,0% (6/15) e 33,3% (5/15), respectivamente. Nas éguas não gestantes, os três grupos apresentaram queda progressiva na concentração média de progesterona, significativamente a partir do 12º dia pós ovulação, não havendo interferência no tempo da ocorrência da luteólise. As taxas de prenhez em receptoras D10 apresentaram índices satisfatórios em receptoras com bom tônus uterino e cervical no dia da TE. Conclui-se que o ácido mefenâmico não impediu a luteólise e não melhorou as taxas de prenhez das receptoras no dia 10 do ciclo estral.

Palavras-chave: ácido mefenâmico, éguas, progesterona, receptora, transferência de embrião.

USE OF MEFENAMIC ACID IN EQUINE EMBRYOS RECIPIENTS

ABSTRACT

In order to extend an acceptable interval between ovulation of the recipient and the day of the embryo transfer (ET), the purpose of this study was to evaluate the effect of mefenamic acid in the ability to maintain corpus luteum function in recipient mares that were on Day 10 (D10) of the estrous cycle, and to verify the pregnancy rate after embryo transfer. 48 embryos were transferred into recipients on Day 10 of the cycle divided into three experimental groups: Group 1 control (n = 18); Group 2 (n = 15) recipients treated with 1g mefenamic acid orally since the eighth until the tenth sixth days after ovulation; Group 3 (n = 15) recipients treated with 1g mefenamic acid orally on day of transfer and for two more days. Six days after ET, pregnancy was confirmed by ultrasound and repeated at 30 days. For analysis of percentages of pregnancy and classification uterine on ET day was used Fisher's exact test and the values

¹ Agradecimento: FAPESP

² Mestrando – Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária -FMVZ- UNESP Botucatu.

³ Professor Adjunto – Depto. de Reprodução Animal Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP. Botucatu, dellaquajr@uol.com.br

Correspondência para: Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Junior, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP, Distrito de Rubião Jr. s/n. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000. Tel: (14) 3811-6249 Fax: (14) 3815-8799.

obtained from the serum progesterone was used ANOVA followed by Tukey test. The control group showed a 33.3% pregnancy rate (6/18). Groups 2 and 3 presented 40.0% (6/15) and 33.3% (5/15), respectively. In non-pregnant mares, all three groups showed a progressive decrease in the mean concentration of progesterone significantly from day 12 post ovulation, without interference in the time of the occurrence of luteolysis. The pregnancy rate in recipients on Day 10 showed satisfactory rates in recipients with good uterine tone and neck on the day of ET. It is concluded that mefenamic acid did not prevent luteolysis and did not improve pregnancy rates of recipients on day 10 of the estrous cycle.

Keywords: mefenamic acid, mares, progesterone, recipient, embryo transfer.

USO DEL ÁCIDO MEFENÁMICO EN RECEPTORAS DE EMBRIONES EQUINOS

RESUMEN

Con el fin de obtener un intervalo aceptable entre la ovulación de la receptora y el día de la transferencia de embriones (TE), el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del ácido mefenámico en la capacidad de mantener la función del cuerpo lúteo en las yeguas receptoras que se encontraban en el décimo día del ciclo estral (D10); y obtener la tasa de gestación después de la transferencia de embriones. Cuarenta y ocho embriones fueron transferidos en el día 10 del ciclo estral y las yeguas receptoras fueron divididas en tres grupos experimentales: Grupo 1 (n = 18) control; Grupo 2 (n = 15) receptoras tratadas con 1 g de ácido mefenámico por vía oral desde el octavo hasta el décimo sexto día después de la ovulación y Grupo 3 (n = 15) receptoras tratados con 1 g de ácido mefenámico por vía oral en el día de la transferencia y dos días consecutivos. Seis días después de la TE, la gestación fue confirmada por ecografía, examen que se repitió a los 30 días. Para el análisis de los porcentajes de gestación y la clasificación uterina en el día de la TE se utilizó la prueba exacta de Fisher y para los valores de progesterona sérica se realizó ANOVA seguido por la prueba de Tukey. El grupo control mostró una tasa de gestación de 33,3% (6/18). Los grupos 2 y 3 mostraron tasas de 40,0% (6/15) y 33,3% (5/15), respectivamente. En las yeguas no gestantes, los tres grupos mostraron una disminución progresiva de la concentración media de progesterona que fue considerada significativa a partir del doceavo de la ovulación, pero que por otro lado, no modificó el momento de la luteólisis. La tasa de gestación en las receptora D10 mostró ser satisfactoria en las yeguas con buen tono tanto de útero como de cuello en el día de la TE. Se concluye que el tratamiento con ácido mefenámico en el décimo día del ciclo estral no impidió la luteólisis y no mejoró la tasa de gestación de las receptoras.

Palabras clave: ácido mefenámico, yeguas, progesterona, receptora, transferencia de embrión.

INTRODUÇÃO

Os índices de recuperação embrionária e taxas de prenhez pós inováção determinam a eficiência de um programa de TE. Fatores inerentes às doadoras, receptoras e ao próprio embrião têm sido cada vez mais estudados com intuito de minimizar estas perdas e aumentar o sucesso da transferência. Segundo Vanderwall et al. (1), a seleção e o manejo adequados de éguas receptoras podem ser os fatores mais importantes para o sucesso de um Programa de Transferência de Embriões em Equinos.

No reconhecimento materno da gestação o conceito sinaliza ao organismo materno para prolongar a vida do corpo lúteo primário e assim assegurar um contínuo suplemento de

progesterona cuja sobrevivência embrionária e desenvolvimento são criticamente dependentes (2-4). A incidência de morte embrionária antes dos sessenta dias de gestação varia de 2,6% a 24%, apresentando uma média de 8,6%, o que gera grandes prejuízos na criação equina (5).

O ambiente uterino se altera marcadamente sobre a influência da progesterona e um embrião exposto a um útero assíncrono pode estar sujeito a fatores de desenvolvimento e níveis hormonais não correspondentes a fase na qual ele se encontra (6). Assim, o intervalo de ovulação entre receptora e doadora deve ser levado em conta na seleção da receptora. A utilização de receptoras em condições naturais antes de quatro dias após a ovulação não tem sido recomendada na literatura, observando-se que, a partir do 9º dia, a taxa de prenhez piora bastante após a transferência, inviabilizando a utilização a partir deste dia (7).

Wilsher, Kolling e Allen (8) investigaram o efeito do tratamento com o antiinflamatório ácido meclofenâmico em receptoras ovuladas 2 e 3 dias antes da doadora e observaram que o índice de prenhez em receptoras tratadas e não tratadas foi de 81% e 44%, respectivamente. O aumento no período de utilização da receptora é sempre um desafio que possibilita recompensa na redução do custo da TE em equinos (9).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido mefenâmico na capacidade de manutenção da função do corpo lúteo em receptoras que se encontravam no dia 10 do ciclo (D10), bem como verificar as taxas de prenhez após a TE.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e período

O presente trabalho foi realizado na central equina de reprodução Genetic Jump, na Fazenda Haras Santa Maria, localizado no município de Itapetininga, SP durante os meses de setembro e outubro das estações reprodutivas de 2009/10 e 2010/11.

Animais

Foi utilizado um total de quarenta éguas mestiças com idade entre 4 e 10 anos, escore corporal 3 a 4 (1-5). Todos os animais estavam em plena atividade reprodutiva e não possuíam quaisquer anormalidades no trato reprodutivo que pudessem ser detectadas por exame de palpação, citologia uterina ou ultrassonografia transretal. As éguas eram mantidas em sistema de confinamento com acesso a água, silagem de milho e sal mineral à vontade, tendo sua alimentação complementada com 2 kg de ração comercial peletizada própria para equinos uma vez ao dia. Dois garanhões com fertilidade comprovada foram utilizados como doadores de sêmen.

Delineamento experimental

As éguas utilizadas como receptoras tiveram seu ciclo acompanhado pela palpação retal e ultrassonografia. Ao atingirem folículo de aproximadamente 35 mm e presença de edema uterino foram induzidas com 1mg de deslorelina I.M. Após confirmação da ovulação as receptoras eram distribuídas aleatoriamente em 3 grupos experimentais:

*Grupo 1 (n=18)

Receptoras com dez dias de ovulação foram utilizadas como controle

*Grupo 2(n=15)

Receptoras com dez dias de ovulação tratadas com 1g de ácido mefenâmico, via oral, do oitavo ao décimo sexto dia pós ovulação.

*Grupo 3 (n=15)

Receptoras com dez dias de ovulação tratadas com 1g de ácido mefenâmico, via oral, no dia da transferência e por mais dois dias.

Produção dos embriões

Foi acompanhado o ciclo das éguas doadoras de embrião pela palpação retal e ultrassonografia. As ovulações das éguas foram induzidas com 1mg de deslorelina I.M. após atingirem folículo de aproximadamente 35 mm e presença de bom edema uterino. Vinte e quatro horas após a indução da ovulação foram inseminadas com 500×10^6 de espermatozoides viáveis. Oito dias após a confirmação da ovulação era realizada a lavagem uterina para recuperação dos embriões.

Transferência dos embriões

Foram realizadas 48 transferências de embrião. Oito dias após ovulação da doadora (considerando-se D0 como o dia da ovulação) os embriões foram coletados. Apenas embriões considerados excelentes e bons foram transferidos. A técnica de transferência foi a transcervical e não-cirúrgica, de acordo com metodologia de Riera e McDonough (10), com a deposição do embrião no interior do útero.

As receptoras foram avaliadas pela palpação retal e ultrassonografia antes da transferência dos embriões, sendo classificadas como: 1) aceitável – tônus uterino e cervical variando de bom a excelente e 2) não aceitável - pouca tonicidade uterina ou cervical (8). Os embriões foram transferidos aleatoriamente para os 3 grupos de receptoras.

Dosagem hormonal

Para determinação das concentrações séricas de progesterona, amostras de sangue foram colhidas por venopunção do oitavo ao décimo oitavo dia pós ovulação a cada 24 horas em todos os grupos estudados. As amostras foram colhidas em tubos de ensaio, centrifugadas a 600 G por 10 minutos e o soro sanguíneo congelado a -20°C até a realização das análises por radioimunoensaio.

Diagnóstico de Gestação

As receptoras foram examinadas pela ultrassonografia transretal seis dias após a transferência dos embriões para determinar a presença ou não de vesícula embrionária. Quando confirmado, o exame era repetido aos 30 dias.

Análise Estatística

Para análise das porcentagens de gestação entre os grupos estudados foi utilizado o teste de Fisher. E o teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey para as variáveis obtidas da dosagem sérica de progesterona. Todas as estatísticas efetuadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

A porcentagem de receptoras que se tornaram prenhes não diferiu estatisticamente entre si, apresentando valores abaixo dos 50% em todos os grupos. As taxas de gestação nos grupos

G2 e G3 foram 40,0% (6/15) e 33,3% (5/15), respectivamente. No grupo controle G1, a taxa de gestação foi de 33,3% (6/18).

Houve apenas uma morte embrionária no G3. As receptoras dos demais grupos permaneceram gestantes até os 30 dias. Não houve diferença na qualidade dos embriões inovulados, pois foram utilizados apenas os de grau 1 e 2.

As concentrações de progesterona nas receptoras gestantes permaneceram constantes em todos os grupos. Nas receptoras não gestantes houve queda semelhante dos níveis de progesterona nos 3 grupos estudados.

Baseando no dia em que as éguas não gestantes obtiveram concentrações menores que 1 ng/ml de progesterona, obteve-se o tempo médio de intervalo entre a ovulação e a luteólise completa subsequente. No G1 controle o tempo médio foi de 14,33 dias pós ovulação. Nos G2 e G3 esse intervalo foi de 14,5 e 14,25 dias, respectivamente.

Foi avaliada a influência do tônus uterino no momento da TE sobre as taxas de gestação nas receptoras de embrião. As éguas dos grupos G1, G2 e G3 classificadas como aceitáveis (tônus uterino e cervical variando de bom a excelente) apresentaram índices de prenhez de 85,7% (6/7), 75% (6/8) e 71,4% (5/7), respectivamente. Em relação as éguas classificadas como não aceitáveis (pouca tonicidade uterina ou cervical) a taxa de gestação foi de 0% em todos os grupos. O tônus uterino e cervical exerceram efeito positivo sobre as taxas de gestação, já que as receptoras D10 com bom tônus uterino e cervical no dia da TE apresentaram maiores índices de prenhez, independente de ter ou não recebido o ácido mefenâmico.

DISCUSSÃO

Na transferência de embrião éguas receptoras que ovulam depois da doadora geralmente são melhores candidatas do que aquelas que ovulam antes, particularmente se a ovulação tiver ocorrido 2 dias antes (11). O uso de receptoras em condições naturais antes de quatro dias após a ovulação não tem sido recomendado na literatura, observando-se que, a partir do 9º dia, a taxa de prenhez piora bastante após a transferência, inviabilizando a utilização a partir deste dia (12). Diferindo desses resultados, Alonso (13) não encontrou diferença nas taxas de prenhez de éguas receptoras de embrião entre os dias 3 e 8 do ciclo.

McKinnon e Squires (14) transferiram embriões em receptoras cujos corpos lúteos encontravam-se entre os dias 5 e 10 após a ovulação, não encontrando diferenças significativas ($p > 0,05$) nas taxas de prenhez. Por outro lado, Alvarenga (15) menciona tendência de melhora, embora não-significativa, nos índices de prenhez quando a idade do corpo lúteo decresce, ou seja, aproxima-se do dia da ovulação.

No presente estudo, embriões foram transferidos apenas em éguas receptoras ovuladas 2 dias antes (D10) da doadora. Verificou-se que com a utilização do ácido mefenâmico nas receptoras do 8º ao 16º dia após ovulação (G2) obteve-se taxa de prenhez de 40,0% (6/15). Nos animais tratados do 10º ao 12º dia pós ovulação (G3) e nas éguas do grupo controle (G1) as taxas de gestação foram 33,3% (6/18) e 33,3% (5/15), respectivamente. Resultados semelhantes foram observados em experimento realizado por Koblischke et al. (16) onde a coleta embrionária foi maior nas receptoras ovuladas no mesmo dia ou dois dias depois da doadora independente de terem sido ou não tratadas com o ácido meclufenâmico ou o flunixin meglumine.

No trabalho de Pool et al. (17) receptoras que ovularam 2 a 3 dias antes da doadora falharam em manter a gestação mesmo sendo tratadas com progestágenos. Valores diferentes, como relatado por Wilsher, Kolling e Allen (18); apresentaram taxas de prenhez de 81% (13/16) em animais que ovularam 2 dias antes (D10) da doadora e que foram tratados com ácido meclufenâmico do nono dia pós ovulação até 7 dias após a transferência do embrião.

Em estudo realizado com camelos, animais tratados com ácido meclofenâmico (a partir do 7º dia após ovulação e por mais 8 dias após T.E) apresentaram taxas de prenhez de 80%, 60% e 70% transferidos em receptoras D8, D10 e D12, respectivamente. Já nos animais do grupo controle o percentual de gestação foi de apenas 10%, cujos embriões foram transferidos em receptoras não tratadas no dia 8 pós ovulação (19).

Analisando os dados obtidos nas éguas dos 3 grupos pode-se observar que a taxa de gestação foi baixa, Ginther (20) sugere que a fixação embrionária ocorre pela interação do aumento do tônus uterino, aumento do tamanho da vesícula embrionária e um impedimento físico para mais movimentos causados pela brusca curvatura ou flexura do corno uterino neste ponto.

Nos 3 grupos deste experimento as concentrações de progesterona permaneceram praticamente constantes nas éguas gestantes. Nas éguas não gestantes a concentração diminuiu gradativamente, principalmente a partir do 12º dia pós ovulação.

Houve apenas uma morte embrionária no G3. As receptoras dos demais grupos permaneceram gestantes até os 30 dias. A perda embrionária tem sido relacionada à baixa concentração de progesterona no início da prenhez (21, 22). Não houve diferença na qualidade dos embriões inovulados, pois foram utilizados apenas os de grau 1 e 2, de acordo com McKinnon e Squires (14).

Resultados diferentes em relação à progesterona foram encontrados por Caiado et al. (7) com o uso de outros antiinflamatórios como o flunixin meglumine; cujas concentrações plasmáticas de P4 foram maiores nas receptoras tratadas. Contudo, a taxa de prenhez foi de 55% (11/20) e 75% (15/20) em éguas tratadas e não tratadas, respectivamente.

Wilsher, Cluton-Brock e Allen (23) trabalhando com embriões D10 e os transferindo em uma janela de sincronia entre -4 (D14) e +9 (D1) relataram que a quantidade de progesterona produzida pela receptora com relação ao seu tempo de ovulação não pareceu ser um pré requisito para a sobrevivência do embrião. Eles observaram que houve influência no desenvolvimento embrionário quando não estão em sincronia, já que retardou o crescimento e a formação do alantóide .E, que independente da sincronia o tempo de fixação embrionária foi de 17 dias.

Vanderwall et al. (1) demonstraram que embriões da espécie equina secretam prostaglandina E2 (PGE2) e a ação da PGE2 no transporte ovidutal de embriões eqüinos foi demonstrada por Woods et al. (24). Por inibir outras prostaglandinas, o flunixin meglumine poderia inibir também a síntese de PG E2 produzida pelo embrião equino, ocorrendo uma diminuição das contrações uterinas e conseqüentemente inibição da mobilidade embrionária o que pode ter afetado o reconhecimento materno da gestação, justificando a menor taxa de prenhez do grupo tratado com esta droga (7).

Skidmore, Billah e Allen (25) também observaram uma menor taxa de gestação em animais tratados com o flunixin meglumine. Foi sugerido que a manipulação e distensão da vagina e cervix pudessem estimular a secreção endógena de PGF2 α do endométrio, o que poderia induzir luteólise prematura e perda da prenhez. Doze camelos receberam 500 mg de antiprostaglandínico, flunixin meglumine, 15 minutos antes da transferência. Amostras de sangue foram colhidas em intervalos regulares. Os resultados mostraram que a estimulação da cervix causou uma leve liberação de PGF2 α que foi suprimido pelo flunixin meglumine. Entretanto, a luteólise prematura não ocorreu indicando que a quantidade de PGF2 α liberada foi insuficiente para causar qualquer prejuízo na função luteal. As receptoras tratadas obtiveram uma taxa de gestação de 16% (2/12) e os animais controle de 67% (10/15).

Os fenamatos impedem que prostaglandinas já formadas se liguem a receptores de PGE2 (26). Entretanto, Koblieschke et al. (16) observaram que o ácido meclofenâmico teve um menor efeito sobre a expressão do mRNA para PGES , em relação ao flunixin meglumine. O PGE, além de seu papel na inflamação, está envolvido no reconhecimento maternal da gestação e estimula a mobilidade intrauterina do concepto equino entre 9 a 16

dias pós ovulação (20, 27). Segundo Mcdowell et al. (28) o tratamento de éguas com flunixin meglumine durante a fase de reconhecimento materno da gestação bloqueou a mobilidade embrionária neste período.

Como não houve seleção de receptora baseado nas características uterinas no momento da TE, as taxas de prenhez das receptoras dos diferentes grupos podem ter sofrido influência. Em experimento realizado por Carnevale et al. (29) éguas que foram classificadas como marginais apresentaram taxas de prenhez estatisticamente inferiores às das éguas classificadas como aceitáveis (70,3% versus 56,2%).

O uso deste antiprostaglandínico não interferiu significativamente com os níveis séricos de progesterona. Além disso, foi observado também que não houve relação entre taxas de prenhez e níveis de progesterona. Em trabalho realizado por Duarte e Vieira (30) também foi demonstrada correlação entre tensão uterina e taxa de gestação, onde éguas com tônus uterino moderado a intenso apresentaram taxas de prenhez de 79,3%, já os animais com tônus uterino ausente ou fraco os índices de prenhez foram 36,8%.

No presente trabalho o uso do antiinflamatório ácido mefenâmico também não foi capaz de aumentar a longevidade ou inibir a ocorrência de lise do corpo lúteo. De acordo com esses resultados, Wilsher, Kolling e Allen (8) também relatam que a luteólise não pôde ser evitada com o ácido meclofenâmico nas éguas que não ficaram gestantes. O tempo médio (dias) do início do estro, ou seja, níveis de progesterona abaixo de 1ng/ml foi de 14,5 e 14,2 dias nos grupos 2 e 3 (31, 32). No grupo 1 (controle) o tempo médio foi de 14,3 dias.

Neste estudo as receptoras dos grupos 1, 2 e 3 que apresentaram tônus uterino e cervical de bom a excelente no dia da TE, obtiveram taxas de gestação de 75%, 85,7% e 71,4%, respectivamente. Segundo Carnevale et al. (29), o tônus uterino reduzido pode indicar um ambiente uterino não compatível com o crescimento e desenvolvimento embrionário. Éguas com tônus uterino ruim a pobre podem ter concentrações de progesterona circulantes mais baixas, o que poderia afetar o tônus uterino e cervical (33).

Verificou-se também neste trabalho que o índice de gestação foi significativamente maior nas éguas que apresentaram tônus uterino e cervical de bom a excelente no momento da inovulação do embrião, independente de ter recebido ou não o tratamento com ácido mefenâmico.

Corroborando com esses resultados, Alonso (13) também reportaram em seu experimento maior taxa de prenhez em éguas com tônus uterino 1 no dia da TE. E as receptoras com tônus uterino 2 apresentaram taxa de prenhez estatisticamente maior em relação às éguas com tônus uterino 3. É citado também a provável relação entre a concentração de estrógeno no estro sobre a expressão de receptores de progesterona no endométrio, os quais afetariam as características uterinas no dia da TE.

A utilização de receptoras D10 seria uma alternativa na transferência de embrião desde que as mesmas apresentem adequado tônus uterino no momento da TE.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente experimento permitem concluir que o ácido mefenâmico não melhorou as taxas de prenhez em receptoras D10, não interferiu na concentração sérica de progesterona e nem no tônus uterino.

REFERÊNCIAS

1. Vanderwall DK, Woods GL, Weber JA, Lichtenwalner AB. PGE 2 secretion by the conceptus and binding by non- pregnant endometrium in the horse. *Equine Vet J.* 1993;15:24-7.

2. Allen WR. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod Domest Anim.* 2001;36:121-31.
3. Kastelic JP, Adams GP, Ginther OJ. Role of progesterone in mobility, fixation, orientation, and survival of the equine embryonic vesicle. *Theriogenology.* 1987; 27:655-63.
4. Spencer TE, Burghart RC, Johnson GA, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 2004;82/83:537-50.
5. Vanderwall DK. Early embryonic loss in the mare. *J Equine Vet Sci.* 2008;28:691-702.
6. Barnes FL. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology.* 2000;53:649-58.
7. Caiado JRC, Fonseca FA, Silva JFS, Caiado JCC, Fontes RS. Aplicação do flunixin meglumine antes da transferência não cirúrgica de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador. *Rev Bras Cir Vet.* 2005;12:11-5.
8. Wilsher S, Kolling M, Allen WR. The use of meclofenamic acid to extend donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. In: *Proceedings of a Workshop on Material Recognition of Pregnancy in the Mare III*; 2004, Barbados. Barbados, West Indies. 2004. p.8-9. Havemeyer Foundation Monograph Series, 16.
9. Jasko DJ. Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 embryos using various transfer devices. *Theriogenology.* 2002;58:713-5.
10. Riera FL, McDonough J. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. *Equine Vet J.* 1993;15:116-9.
11. Sharp DC, Cleaver BD. Photoperiod. In: Mckinnon AO, Voss JL. *Equine reproduction.* Malvern: Lea & Febizer; 1992. cap.19, p.179-85.
12. Caiado JRC, Fonseca FA, Silva JFS, Fontes RS. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós ovulação. *Rev Bras Zootec.* 2007;36:360-8.
13. Alonso MA. Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2007.
14. Mckinnon AO, Squires EL. Morfologic assesment of the equine embryo. *J Am Vet Med Assoc.* 1988;192:401-6.
15. Alvarenga MA. Efeito de alguns fatores sobre índices de coleta e transferência de embriões em equinos [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 1989.
16. Koblischke P, Kindahl H, Budik S, Aurich J, Palm F, Walter I, et al. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipients mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology.* 2008;70:1147-58.

17. Pool KF, Wilson JM, Webb GW, Kraemer DC, Potter GD, Evans JW. Exogenous hormone regimes to utilise successfully mares in dioestrus (days 2 to 14 after ovulation) as embryo transfer recipients. *J Reprod Fertil.* 1987;35:429-32.
18. Wilsher S, Kolling M, Allen WR. Meclofenamic acid extends donor recipient asynchrony in equine embryo transfer. *Equine Vet J.* 2006;38:428-32.
19. Skidmore JA, Billah M. Embryo transfer in the dromedary camel using asynchronous, meclofenamic acid- treated recipients. *Reprod Fertil Dev.* 2005;17:417-21.
20. Ginther OJ. Mobility of the equine conceptus. *Theriogenology.* 1983;19:603-11.
21. Douglas RH, Burns PJ, Hershman L. Physiological and commercial parameters for producing progeny from subfertile mares by embryo transfer. *Equine Vet J.* 1985;3:111-4.
22. Ginther OJ. Dinamic physical interaction between the equine embryo and uterus. *Equine Vet J.* 1985;3:41-7.
23. Wilsher S, Cluton-Brock A, Allen WR. Successful transfer of day 10 horse embryos: influence of donor-recipient asynchrony on embryo development. *Reproduction.* 2010; 139:575-85.
24. Woods GL, Weber JA, Vanderwall DK, Freeman DA. Selective oviductal transport and fertilization rate of equine embryos. In: *Proceedings of the 37^o Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners; 1991, Lexington. Lexington: USDA; 1991. p.197-201.*
25. Skidmore JA, Billah M, Allen WR. Investigation of factors affecting pregnancy rate after embryo transfer in dromedary camels. *Reprod Fertil Dev.* 2002;14:109-16.
26. Rees MCP, Canete-Soler R, Bernal AL, Turnbull AC. Effect of fenamates on prostaglandin e receptor binding. *Lancet.* 1988;2:541-2.
27. Stout TAE, Allen WR. Prostaglandin E2 and F2_α production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *J Reprod Fertil.* 2002;123:261-8.
28. McDowell KJ, Sharp DC, Grubaugh W, Thatcher WW, Wilcox CJ. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biol Reprod.* 1988;39:340-8.
29. Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death equine embryo transfer. *Theriogenology.* 2000;54:965-79.
30. Duarte MB, Vieira RC. Efeito da fenilbutazona sobre as taxas de prenhez em éguas receptoras de embriões. *Acta Sci Vet.* 2003;31:32.
31. Vivo R, Santisteban R, Tovar P, Castejon MF. Valores de progesterona en plasma de yeguas españolas y arabs durante el ciclo reproductor. *Arch Zootec.* 1986;35:59-67.

32. Oba E, Moreira AF, Mamprim MJ. Progesterone and LH serum concentration in adult mares during oestrus [Free Communications]. In: Proceedigns of the 12^o International Congress on Animal Reproduction; 1992, Netherlands. Hague; 1992. p.1900-2.
33. Ginther OJ. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2^a ed. Wisconsin: Cross Plains, Equiservices; 1992.

Recebido em: 03/02/12

Aceito em: 27/06/12

RESISTÊNCIA DE *Lactobacillus* sp. ISOLADOS DE SALAMES ARTESANAIS PRODUZIDOS NA REGIÃO SUL DO BRASIL A ANTIBIÓTICOS

Tais H. Justo¹
Loyse Tussolini²
Renata Ernlund Freitas de Macedo³
Hanna Lethycia Wolupeck⁴
Herta Stutz Dalla Santa⁵
Osmar Roberto Dalla Santa⁶

RESUMO

Os antibióticos podem ser usados na produção animal com fins terapêuticos e/ou profiláticos ou como promotores de crescimento. Entretanto, o emprego indiscriminado dessas drogas possibilita o surgimento de micro-organismo antibiótico-resistentes e a transferência de genes de resistência para outros micro-organismos, incluindo os da microbiota intestinal, fomentando assim o aparecimento de micro-organismo resistentes no homem. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e verificar a presença de resistência a 11 tipos de antibióticos de 45 cepas de bactérias lácticas isoladas de salames produzidos artesanalmente na região Sul do País. As cepas, identificadas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, apresentaram multirresistência a no mínimo oito antibióticos, sendo que 17 (37,77%) delas foram resistentes aos 11 agentes antimicrobianos testados: cefepine, clindamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, penicilina G, rifampicina, tetraciclina e vancomicina. Todas as cepas foram resistentes a ciprofloxacina, gentamicina, oxacilina, penicilina, rifampicina, tetraciclina e vancomicina. Os salames produzidos de modo artesanal, sem adição de cultura *starter* comercial, apresentaram cepas de *Lactobacillus* com amplo perfil de resistência antimicrobiana e podem ser potenciais veiculadores de genes antibiótico-resistentes a outros micro-organismos e representar perigo à saúde humana.

Palavras-chave: salame, fermentação natural, bactérias lácticas, resistência antimicrobiana.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Lactobacillus* sp. ISOLATED FROM NATURALLY FERMENTED SALAMI PRODUCED IN SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT

Antibiotics can be used in animal production for therapeutic or prophylactic purposes or as growth promoters. However, the indiscriminate use of these drugs allows the emergence of antibiotic-resistant microorganisms and the transference of resistance genes to other microorganisms, including those of the intestinal flora, thus promoting the emergence of resistant microorganisms in man. The aim of this study was to characterize and verify the

¹ Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO. Rua Padre Salvador, 875 CEP 85015-430 Guarapuava-PR Fone: (42) 3621-1000 (taishoboldjusto@hotmail.com).

² Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO. Rua Padre Salvador, 875 CEP 85015-430 Guarapuava-PR Fone: (42) 3621-1000 (loysetussolini@hotmail.com).

³ Professora Doutora do Mestrado em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR. Rodovia BR 376-Km 14 Costeira CEP 83010-500 São José dos Pinhais-PR Fone: (41) 32994334 (renata.macedo@pucpr.br).

⁴ Médica Veterinária, mestranda em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR Rodovia BR 376-Km 14 Costeira CEP 83010-500 São José dos Pinhais-PR Fone: (41) 32994334 (lethyciawolupeck@yahoo.com.br)

⁵ Professora Doutora do Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, Rua Padre Salvador, 875 CEP 85015-430 Guarapuava-PR Fone: (42) 3621-1000 (hdalsanta@yahoo.com).

⁶ Professor Doutor do Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, Rua Padre Salvador, 875 CEP 85015-430 Guarapuava-PR Fone: (42) 3621-1000 (ordallasanta@yahoo.com.br).

antimicrobial resistance against 11 antibiotics of 45 strains of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented salami from Southern Brazil. Strains were identified as belonging to the genus *Lactobacillus* and showed multi-resistance to at least 8 antibiotics. Seventeen (37.77%) strains were resistant to all of the 11 antibiotics: cefepine, chloramphenicol, clindamycin, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, oxacillin, penicillin G, rifampin, tetracycline and vancomycin. All strains were resistant to ciprofloxacin, gentamicin, oxacillin, penicillin, rifampin, tetracycline and vancomycin. Salami produced by natural fermentation, with no addition of commercial starter culture, presented *Lactobacillus* with large antimicrobial resistance profile and may be a potential carrier of antibiotic-resistant genes to other organisms and a hazard to human health.

Keywords: salami, natural fermentation, acid lactic bacteria, antimicrobial resistance.

RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE LACTOBACILLUS SP. AISLADOS DE SALAME ARTESANAL PRODUCIDO EN LA REGIÓN SUR DE BRASIL

RESUMEN

Los antibióticos pueden ser usados en la producción animal con fines terapéuticos y/o profilácticos o como promotores de crecimiento. Sin embargo, el empleo indiscriminado de esos fármacos posibilita el surgimiento de microorganismos antibiótico-resistentes y la transferencia de genes de resistencia para otros microorganismos, incluyendo los de la microbiota intestinal, causando así la aparición de microorganismos resistentes en el hombre. El objetivo de este trabajo fue caracterizar y verificar la resistencia a 11 tipos de antibióticos en 45 cepas de bacterias lácticas aisladas de salami producido artesanalmente en la región Sur de Brasil. Las cepas identificadas del género *Lactobacillus* presentaron resistencia múltiple a por lo menos ocho tipos de antibióticos y 17 (37,77%) de ellas fueron resistentes a los 11 agentes antimicrobianos probados: cefepine, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina, oxacilina, penicilina G, eritromicina, clindamicina y vancomicina. Todas las cepas fueron resistentes a ciprofloxacina, gentamicina, oxacilina, penicilina, rifampicina, tetraciclina y vancomicina. El salami producido de manera artesanal, sin adición de cultivo starter comercial, presentó cepas de *Lactobacillus* con amplio perfil de resistencia antimicrobiana y puede ser un vehículo potencial de genes antibiótico-resistentes para otros microorganismos, lo que representa un peligro para la salud humana.

Palabras clave: salami, fermentación, bacterias lácticas, resistencia antimicrobiana

INTRODUÇÃO

Os antibióticos são normalmente utilizados na produção animal com finalidade terapêutica e/ou profilática. Eles são também empregados como promotores de crescimento com o objetivo de promover maior velocidade no crescimento e engorda dos animais, assim como para elevar a taxa de natalidade das criações (1). Entretanto, o emprego indiscriminado dessas drogas pode ocasionar diversas complicações entre as quais, e talvez a mais importante delas, o surgimento de micro-organismos antibiótico-resistentes, que por sua vez, criam a necessidade cada vez maior do desenvolvimento de novas drogas para combatê-los (2).

A cadeia de produção de alimentos tem sido reconhecida como uma das principais rotas de transmissão de bactérias antibiótico-resistentes entre animais e seres humanos (3). Bactérias resistentes a antibióticos podem contaminar os alimentos, especialmente a carne, ainda que as normas de higiene durante sua manipulação sejam respeitadas (4, 5). Diversos

estudos comprovam a presença de resistência aos antibióticos em bactérias lácticas isoladas de carne crua (6, 7).

As bactérias lácticas são largamente utilizadas em embutidos fermentados, como os salames, como culturas iniciadoras (*starter*) para propiciar aumento da vida de prateleira e perfil sensorial diferenciado. Elas também vêm sendo adicionadas nestes produtos com finalidade probiótica para exercer efeitos benéficos à saúde como a manutenção da microbiota intestinal, a exclusão competitiva de patógenos e a estimulação do sistema imunológico (8, 9).

Apesar das bactérias lácticas utilizadas em salames serem reconhecidas como seguras (*Generally Recognized as Safe - GRAS*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (10), elas podem atuar como transmissoras de genes antibiótico-resistentes a outras bactérias, incluindo as patogênicas (11, 12), visto que a resistência antimicrobiana normalmente é determinada geneticamente por conjugação via plasmídeos ou transposons (13). Este risco é ainda maior nos salames coloniais obtidos pela fermentação da microbiota nativa da carne e que não recebem a adição de culturas *starter* selecionadas.

Neste sentido, os salames artesanais que são normalmente consumidos sem prévio tratamento térmico e nos quais a fermentação ocorre naturalmente, por bactérias lácticas da microbiota da carne e que não passaram por testes seletivos de sensibilidade a antibióticos, são fontes potenciais de bactérias viáveis portadoras de genes resistentes a antibióticos. Pouco se sabe sobre a contribuição das bactérias lácticas presentes nos salames artesanais na disseminação de genes resistentes (14). Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar morfológicamente e avaliar a frequência de resistência antimicrobiana de bactérias lácticas obtidas de salames artesanais produzidos na região Sul do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos Salames

Durante o ano de 2005, foram coletadas aleatoriamente 50 amostras de salames artesanais comercializados em supermercados e feiras-livres nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Todos os salames coletados eram produzidos por fermentação espontânea em pequenas indústrias, pois, de acordo com as informações contidas no rótulo não eram adicionadas de cultura *starter*. As amostras coletadas estavam dentro do período de validade para consumo.

Isolamento das bactérias lácticas

Previamente à coleta das amostras, procedeu-se a remoção asséptica do envoltório dos salames. De cada salame foram coletados 25 g de amostra que foram adicionados a 225 mL de água peptonada estéril (0,1%) e homogeneizados para as diluições seriadas. Posteriormente às diluições, 1 mL foi inoculado em ágar De Man Rogosa e Sharpe (MRS, Oxoid) adicionado de solução de azul de anilina estéril por semeadura em profundidade. As placas foram incubadas a 35° C/ 48 h (15-17). De cada amostra de salame avaliada foram selecionadas 4 colônias crescidas nas placas com ágar MRS, com morfologias distintas para estocagem e posterior caracterização morfológica e teste de resistência a antibióticos.

Caracterização morfológica e identificação das bactérias lácticas

A identificação morfológica foi realizada por visualização direta ao microscópio das células bacterianas e pelo método tradicional de coloração de Gram. A verificação da produção da enzima catalase pelas cepas de bactérias lácticas foi realizada pela adição de 3 gotas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ a 3%) diretamente sobre as colônias e observação de efervescência (18). A presença da enzima oxidase nas culturas de bactérias lácticas foi verificada pela utilização de tiras de reação de oxidase (Laborclin[®]).

Resistência antimicrobiana

A resistência a antibióticos foi avaliada pelo método de disco-difusão em 45 cepas de bactérias lácticas, as quais foram selecionadas, do total das isoladas, por apresentarem potencial tecnológico (dados não apresentados) (19). Os seguintes antibióticos foram testados: cefepine (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg); oxacilina (1 µg), penicilina G (10 U), rifampicina (5 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg) (Laborclin®).

As bactérias lácticas foram semeadas em placas com ágar MRS (Oxoid) com o auxílio de *swab*. Após a absorção completa do inóculo, os discos com os diferentes antibióticos foram colocados na superfície do meio de cultura. A resistência ou sensibilidade das cepas aos antibióticos foi avaliada após incubação das placas a 37°C por 24 horas pela medida do halo de inibição do crescimento formado em milímetros ao redor do disco de antibiótico que foi verificada com auxílio de paquímetro (19). Os ensaios foram realizados em duplicata.

Para testes de resistência antimicrobiana de bactérias lácticas pelo método de disco-difusão, Charteris et al. (20) propuseram pontos de corte para 5 dos 11 antibióticos testados no presente trabalho. Desta forma, a interpretação dos testes de resistência dos isolados ao cloranfenicol, eritromicina, penicilina, tetraciclina e vancomicina foi realizada seguindo critério proposto por Charteris et al. (20). Para os demais antibióticos foram utilizados os padrões interpretativos estabelecidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (21), sendo que para os testes com cefepine, ciprofloxacina e gentamicina foram considerados como referência os pontos de corte para *Enterobacteriaceae*, para rifampicina os pontos de corte para *Enterococcus* spp e para clindamicina e oxacilina os pontos de corte para *Staphylococcus* spp.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento, caracterização e identificação das bactérias lácticas

Todos os isolados lácticos apresentaram morfologia de bacilo e coloração de Gram positiva, sendo identificados como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (22). Variações no tamanho dos bacilos entre as cepas foram observadas, o que indica a presença de várias espécies ou linhagens diferentes de *Lactobacillus* nas amostras de salames produzidos por fermentação espontânea.

Nos testes de catalase e de oxidase, todas as cepas avaliadas mostraram reação negativa (23, 24). Embora todas as cepas tenham se mostrado catalase negativas, a catalase positiva é uma característica interessante nas culturas utilizadas na fabricação de produtos fermentados, visto que o peróxido de hidrogênio pode participar de reações que provocam a descoloração dos produtos e desta forma, descaracterizá-los sensorialmente. Entre os lactobacilos, somente algumas espécies, como *Lactobacillus mali*, podem apresentar pseudo-catalase (25).

Resistência a antibióticos

Entre outros fatores, a ausência ou frequência mínima de resistência a antibióticos é um dos requisitos que fazem uma cultura *starter* ou probiótica ser considerada ideal para uso humano ou animal. Desta forma, bactérias para uso potencial em humanos ou animais não devem apresentar elementos genéticos que determinem resistência antimicrobiana (26). A utilização de antibióticos como promotores de crescimento em espécies domésticas, mesmo que em baixas dosagens (20 mg a 150 mg/kg alimento), pode levar ao aparecimento de linhagens resistentes a antibióticos na microbiota intestinal (27). Portanto, a utilização de antibióticos em animais deve ser prudente, de modo a minimizar os impactos negativos sobre a eficácia dessas drogas em posteriores utilizações na medicina humana (28).

Estudos demonstraram a presença de genes que conferem resistência a vários antimicrobianos como cloranfenicol, eritromicina, streptomomicina, tetraciclina e vancomicina

em plasmídeos de *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* isolados de diversos alimentos (29). No presente estudo, todas as 45 cepas lácticas isoladas apresentaram algum nível de resistência aos 11 antibióticos testados (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das cepas de bactérias lácticas isoladas de salames de fermentação espontânea da região Sul do Brasil frente aos diferentes antibióticos testados

Antibióticos/ concentração	Valores de corte* (Medida do halo de inibição em mm)		Número de cepas classificadas		
	Resistentes	Suscetíveis	R	I	S
Cefepine ³ (30 µg)	≤14	≥18	27	13	5
Ciprofloxacina ³ (5 µg)	≤15	≥21	45	-	-
Clindamicina ² (2 µg)	≤14	≥21	40	5	-
Cloranfenicol ¹ (30 µg)	≤13	≥14	26	6	13
Eritromicina ¹ (15 µg)	≤13	≥14	44	-	1
Gentamicina ³ (10 µg)	≤12	≥15	45	-	-
Oxacilina ² (1 µg)	≤10	≥13	45	-	-
Penicilina G ¹ (10 U)	≤19	≥20	45	-	-
Rifampicina ⁴ (5 µg)	≤16	≥20	45	-	-
Tetraciclina ¹ (30 µg)	≤14	≥15	45	-	-
Vancomicina ¹ (30 µg)	≤14	≥15	45	-	-

¹valores de corte propostos por Charteris et al, 1998 ²valores de corte propostos pelo CLSI (2005) para *Staphylococcus spp.*, ³valores de corte propostos pelo CLSI (2005) para *Enterobacteriaceae*, ⁴valores de corte propostos pelo CLSI (2005) para *Enterococcus spp.*

R - resistente; I - intermediário; S - suscetível

Das 45 cepas isoladas, 44 (97,77%) apresentaram resistência à eritromicina. Em pesquisa realizada por Gomes et al. (30), observou-se que das enterobactérias isoladas de diferentes alimentos, as cepas de *Enterococcus faecium* apresentaram resistência à eritromicina, tetraciclina e vancomicina, enquanto os isolados de *Enterococcus faecalis* apresentaram resistência à tetraciclina, eritromicina e a altas concentrações de gentamicina, porém foram sensíveis à vancomicina.

A resistência à eritromicina e oxacilina em *Lactobacillus* foi verificada em sete das 67 cepas estudadas por Danielsen e Wind (31). Esses resultados são diferentes dos obtidos no presente trabalho, no qual 97,77% das cepas foram resistentes à eritromicina e 100% resistentes à oxacilina.

Verificou-se que 100% das bactérias lácticas isoladas neste estudo foram resistentes à ciprofloxacina, gentamicina, oxacilina, penicilina, rifampicina, tetraciclina e vancomicina (Figura 1).

Até a segunda década do século XX, a resistência a tetraciclina em bactérias patogênicas e da microbiota natural era rara (32). Hughes e Datta (33) relataram que de um total de 433 enterobactérias isoladas de diversas fontes biológicas e do ambiente entre os anos de 1917 e 1954, apenas 2% era resistente à tetraciclina. No presente estudo todas as 45 bactérias lácticas testadas mostraram resistência a este antibiótico.

O uso intensivo de antibióticos, a partir de sua introdução na terapêutica nos anos 1940, poderia explicar a difusão de plasmídeos de resistência antimicrobiana entre os microorganismos que a adquirem pela inserção de genes específicos em seu DNA. Segundo Chopra e Roberts (34) há mais de 30 determinantes genéticos caracterizados para a resistência à tetraciclina. Dentre eles, estão os genes *tet A*, *B* e *C* que codificam a bomba presente na membrana interna de bactérias com função de reduzir o nível de tetraciclina no interior do citoplasma. Esses determinantes têm sido encontrados nos plasmídeos e nos cromossomos das bactérias resistentes (35). Em bactérias lácticas, estudos *in vitro* detectaram a habilidade de

Lactobacillus em transferir resistência à tetraciclina por conjugação a outras bactérias lácticas como *Enterococcus faecalis* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, porém esta habilidade não foi verificada para transferência de resistência de *Lactobacillus* a cepas de *Staphylococcus aureus* (36). A habilidade de transferência horizontal da resistência a antibióticos via plasmídeo de *L. plantarum* para *Enterococcus faecalis* foi confirmada também em estudos *in vivo* (37).

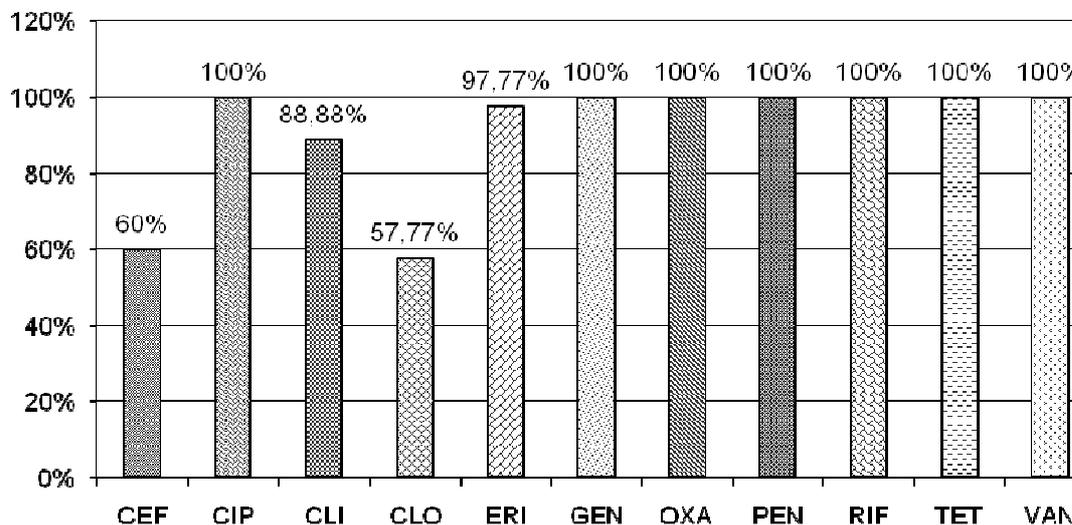


Figura 1. Frequência de resistência em porcentagem a antimicrobianos das cepas de bactérias lácticas isoladas de salames de fermentação espontânea da região Sul do Brasil

CEF - Cefepine (30 µg), CIP – Ciprofloxacina (5 µg), CLI – Clindamicina (2 µg), CLO – Cloranfenicol (30 µg), ERI – Eritromicina (15 µg), GEN – Gentamicina (10 µg), OXA – Oxacilina (1 µg), PEN – Penicilina G (10 U), RIF – Rifampicina (5 µg), TET – Tetraciclina (30 µg), VAN – Vancomicina (30 µg).

Estudos com cepas de *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus* e *L. plantarum* demonstraram resistência intrínseca desses micro-organismos a diferentes antibióticos (38, 39). Em pesquisa com espécies de *Lactobacillus* isoladas de carne e salames foram encontrados determinantes genéticos para a resistência à tetraciclina, gentamicina, penicilina e canamicina (40).

A resistência à vancomicina parece ser intrínseca em alguns gêneros de bactérias lácticas como *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (13). Essa resistência natural deve-se à presença de enzimas relacionadas à d-alanina: d-ligase (31). Korhonen, Sclivagnotis e Von Wright (41) observaram que todas as 67 cepas lácticas provenientes do intestino de leitões demonstraram resistência à vancomicina, assim como Tang et al. (42) que constataram o mesmo tipo de resistência em todas as nove cepas de bactérias lácticas isoladas de medicamentos compostos de probióticos. Macedo et al. (43) testaram quatro culturas lácticas oriundas de culturas padrão (ATCC) e de culturas *starter* (CHR HANSEN) para salames e verificaram 100% de resistência à vancomicina.

Os resultados demonstraram que 26 (57,77%) cepas foram resistentes ao cloranfenicol, seis (13,33%) apresentaram reação intermediária e 13 (28,88%) foram sensíveis a este antibiótico. Apesar do uso de cloranfenicol na produção e terapêutica animal ser proibido no Brasil desde 2003 (44) e na Comunidade Européia desde 1994 (45), ele ainda é motivo de preocupação devido ao seu emprego irregular e dos efeitos prejudiciais à saúde associados à anemia aplástica.

Os resultados obtidos neste trabalho para a resistência de bactérias lácticas ao cloranfenicol foram superiores aos obtidos por diversos autores em diferentes países. Em 1995, todas as cepas de *Lactobacillus acidophilus* testadas por Gupta e Mittal (46) foram

sensíveis ao cloranfenicol. Igualmente, as cepas foram sensíveis à eritromicina e tetraciclina. Outro estudo realizado em 2003 na Dinamarca verificou que de 66 cepas de *Lactobacillus* obtidas liofilizadas de uma coleção de culturas, apenas sete apresentavam resistência ao cloranfenicol pela presença de genes transferíveis de resistência ao antibiótico (31). Em 2007 Korhonen, Sclivagnotis e Von Wright (41) verificaram 100% de suscetibilidade ao cloranfenicol nas 67 cepas de bactérias lácticas isoladas das fezes de leitões.

Macedo et al. (43) observaram suscetibilidade de todas as cepas lácticas testadas frente à rifampicina, contrariando os resultados deste estudo (100% de resistência).

Para verificar a sensibilidade/ resistência das cepas à clindamicina foram utilizados os valores de corte estabelecidos para *Staphylococcus spp* pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (21), pois não há referencial dessa droga para bactérias lácticas. Em função disso, 40 das cepas testadas foram consideradas resistentes e cinco apresentaram resistência intermediária à clindamicina.

Segundo Ammor, Flórez e Mayo (47), os *Lactobacillus* tendem a ser mais suscetíveis a antibióticos que inibem a síntese de proteínas como cloranfenicol, eritromicina, clindamicina e tetraciclina e mais resistentes aos aminoglicosídeos como a gentamicina. Em concordância com as observações destes autores, todas as cepas testadas no presente trabalho foram resistentes à gentamicina. Contudo, também observou-se 100% de resistência à tetraciclina e 97,77% à eritromicina. Barbosa et al. (48) verificaram resistência à gentamicina em outros gêneros de bactérias lácticas como *Bifidobacterium*.

A resistência microbiana a quatro ou mais antibióticos, classificada como multiresistência, foi constatada em todas as cepas analisadas, sendo que destas, 17 (37,77%) apresentaram resistência aos 11 antibióticos testados (Figura 2). Quinze (33,33%) cepas apresentaram resistência a 10 antibióticos testados, 11 (24,44%) a nove antibióticos e dois (4,44%) a oito tipos de antibióticos.

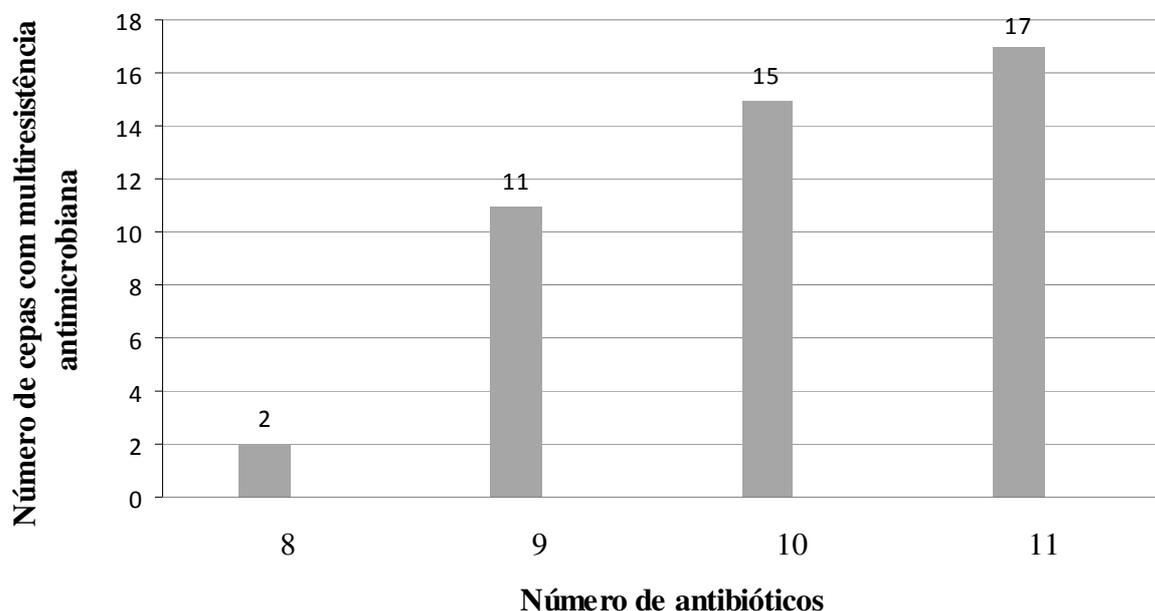


Figura 2. Multiresistência a antibióticos de cepas de bactérias lácticas isoladas de salames coloniais.

A multiresistência pode ser oriunda da resistência natural que as cepas possuem frente ao agente ou pode ser decorrente de resistência adquirida, sendo difícil a distinção entre os dois tipos (49). Temmerman et al. (50) relataram que 67% de 187 cepas lácticas isoladas de produtos probióticos da Europa apresentaram multiresistência.

Apesar da possibilidade de ocorrência de resistência antimicrobiana nas culturas *starter* utilizadas na produção de salames, normalmente a frequência de resistência nessas culturas é baixa, visto que as cepas de bactérias lácticas destinadas ao uso como *starter* em produtos

cárneos são previamente selecionadas de forma a não apresentar capacidade de multirresistência antimicrobiana, especialmente resistência adquirida. Desta forma, a multirresistência observada nas bactérias lácticas isoladas dos salames artesanais, que não levam a adição de culturas *starter* padronizadas e selecionadas industrialmente, é preocupante uma vez que esses alimentos podem servir como veículo de genes antibiótico-resistentes à microbiota intestinal dos seres humanos após seu consumo.

CONCLUSÃO

As bactérias lácticas testadas mostraram multirresistência antimicrobiana, sendo resistentes a no mínimo oito antibióticos testados. Os salames artesanais mostraram uma vasta microbiota antibiótico-resistente que pode representar perigo à saúde humana pela transferência de genes resistentes à microbiota intestinal quando consumidos e determinar a ação ineficiente das drogas usadas na antibioticoterapia humana.

REFERÊNCIAS

1. Cancho-Grande B, García-Falcón MS, Simal-Grándara J. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Cienc Tecnol Aliment.* 2000;3:37.
2. Mota RA, Silva KPC, Freitas MFL, Porto WJN, Silva LBG. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2005;42:465-70.
3. Witte W. Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;16:19-24.
4. Salyers AA. Out of the ivory tower: bacterial gene transfer in the real world. In: *Antibiotic resistance transfer in the mammalian intestinal tract: implications for human health, food safety and biotechnology.* Berlin: Springer-Verlag; 1995. p.109-36.
5. Witte W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science.* 1998;279: 996-7.
6. Klein G, Hallmann C, Casas IA, Abad J, Louwers J, Reuter G. Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *J Appl Microbiol.* 1998;89:815-24.
7. Pavia M, Nobile CGA, Salpietro L, Angelillo IF. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J Food Prot.* 2000;63:912-5.
8. Marteau P, Rambaud JC. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol Lett.* 1993;12:207-20.
9. Aiba Y, Suzuki N, Kabir AMA, Takagi A, Koga Y. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol.* 1998;93:2097-101.
10. Feord J. Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002;82:353-60.

11. Gevers D, Danielsen M, Huys G, Swings J. Molecular characterization of tet (M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:1270-5.
12. D'aimmo MR, Modesto M, Biavati B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *Int J Food Microbiol.* 2007;115:35.
13. Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *Food Microbiol.* 2005;105:281-95.
14. Lehman M. Assessment of antibiotic resistant commensal bacteria in food [thesis]. Ohio: State University; 2006.
15. Giraud E. Contribution a l'étude physiologique et enzymologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amylolytique isolée du manioc fermenté [these]. Marseille: Université de Provence aix-Marseille; 1992.
16. Samelis J, Genakis MF, Metaxopoulos J. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int J Food Microbiol.* 1994;23: 179-96.
17. Samelis J, Metaxopoulos J, Vlassi M, Pappa A. Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. *Int J Food Microbiol.* 1998;44:69-82.
18. Villani F, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S. Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. *J Appl Microbiol.* 1997;82:578-88.
19. Boyle VJ, Fancher ME, Ross RW. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks. *Antimicrob Agents Chemother.* 1973;3:418.
20. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot.* 1998;61:1636-43.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º suplemento informativo. M100-S15. Wayne: CLSI; 2005.
22. Wood BJB, Holzappel WH. The genera of lactic acid bacteria. London: Blackie Academic & Professional; 1995.
23. Coppola S, Mauriello G, Aponte M, Moschetti G, Villani F. Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. *Meat Sci.* 2000;56:321-9.
24. Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 2003;65:859-67.
25. Roissart H, Luquet FM. Bactéries lactiques – aspects fondamentaux et technologiques. Urige: Lorica; 1994. v.1.

26. Aarestrup FM, Bager F, Jensen NE, Madsen M, Meyling A, Wegener HC. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 1998;106:602-22.
27. Nicodemo MLF. Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte [Internet]. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; 2002 [acesso em 2010 Fev 10]. Doc 106. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc106/05antibioticos.html>
28. Costal FN, Rossi Júnior OR, Amaral LA. Action of antimicrobial in *Aeromonas* strains isolated at different places of the processing poultry plant. *Rev Port Cienc Vet.* 2003;98:95-9.
29. Flórez AB, Delgado S, Mayo B. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Can J Microbiol.* 2005;51:51-8.
30. Gomes BC, Esteves CT, Palazzo ICV, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.* 2008;25:668-75.
31. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol.* 2003;82:1-11.
32. Levy SB. Evolution and spread of tetracyclines resistance determinants. *J Antimicrob Chemother.* 1989;24:1-3.
33. Hughes VM, Datta N. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature.* 1983;302:725-6.
34. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65: 232-60.
35. Sørum H, L'abe'E-Lund TM. Antibiotic resistance in food-related bacteria - a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *Int J Food Microbiol.* 2002;78: 43-56.
36. Gevers D, Huys G, Swings J. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 225:125-30.
37. Jacobsen L, Wilcks A, Hammer K, Huys G, Gevers D, Andersen SR. Horizontal transfer of tet(M) and erm(B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;59:158-66.
38. Holley RA, Blaszyk M. Antibiotic challenge of meat starter cultures and effects upon fermentations. *Food Res Int.* 1997;30:513-22.
39. Teuber M, Perreten V. Role of milk and meat products as vehicles for antibiotic-resistant bacteria. *Acta Vet Scand.* 2000;93:75-87.

40. Gevers D, Masco L, Baert L, Huys G, Debevere J, Swings J. Prevalence and diversity of tetracycline resistant lactic acid bacteria and their tet genes along the process line of fermented dry sausages. *Syst Appl Microbiol.* 2003;26:277-83.
41. Korhonen JM, Sclivagnotis Y, Von Wright A. Characterization of dominant cultivable lactobacilli and their antibiotic resistance profiles from faecal samples of weaning piglets. *J Appl Microbiol.* 2007;103:2496-503.
42. Tang H, Yuan J, Xie CH, We H. Antibiotic susceptibility of strains in Chinese medical probiotic products. *J Med Coll PLA.* 2007;22:149-52.
43. Macedo RF, Planzer Jr SB, Terra NN, Freitas RJS. Características de culturas lácticas probióticas para uso em produtos cárneos fermentados: sensibilidade aos sais de cura e uso de antibióticos para contagem seletiva. *Bol Centro Pesqui Process Aliment.* 2005;23:123-34.
44. Ministerio da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 09, de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos. *Diário Oficial da União, Brasília (DF),* 2003 Jun 30.
45. Official Journal of the European Community. Commission regulation n. 1430/94, of 22 June 1994. Brussels; 1994. p.156/6.
46. Gupta PK, Mittal BK. Antibiotic sensitivity pattern of various *Lactobacillus acidophilus* strains. *Indian J Exp Biol.* 1995;33:620-1.
47. Ammor MS, Flórez AB, Mayo B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 2007;24:559-70.
48. Barbosa FH, Silva AM, Duarte R, Nicoli JR. Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana de *Bifidobacterium bifidum*. *Rev Biol Cienc Terra.* 2001;1:1-11.
49. Teuber M, Meile L, Schwarz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antoine Van Leewenhoek.* 1999;76:115-37.
50. Temmerman R, Pot B, Huys G, Swings J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol.* 2003;81:1-10.

Recebido em: 12/04/11

Aceito em: 31/07/12

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF DOG BITES CONSIDERING BITER DOGS AND VICTIMS

Luzia Helena Queiroz¹
Daniel Sartore Buso²
José Erisvaldo Silva²

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize dog bites using data on biter dogs and victims. An exploratory cross-sectional study was performed using 203 records of individuals who had attended in public health services in 2009 in the municipality of Araçatuba, São Paulo, Brazil, after they had been bitten by a dog. Over 70% (92/129) of the biter dogs were male and most of them (71%) received as a gift. Dog owners reported companionship as the main reason for acquiring the dog. The victims who were children were predominantly male, while the victims who were elderly were predominantly female. Most children were bitten on the head/neck, while adults were bitten on the hands/feet and lower limbs ($p < 0.0001$). The owner of the dog was known in 83.2% of cases. However, rabies observation of the biter dog following the attack was only reported in 59.4% of cases. Situations involving aggression were related to dogs having escaped from their home (18.7%) or roaming free on the streets (17.0%). The analysis of biting dog characteristics using information obtained from dog bite victims and biting dog owners can help direct the medical treatment for dog bite victims. Moreover, concepts of responsible dog ownership can reduce the occurrence of bites.

Keywords: dogs, aggression, bites and stings, rabies, post exposure prophylaxis

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS AGRESSÕES POR CÃES SOB O PONTO DE VISTA DO CÃO AGRESSOR E DAS VÍTIMAS.

RESUMO

O presente estudo buscou caracterizar as agressões por cães, envolvendo dados sobre o animal e sua vítima. Foi realizado um estudo exploratório transversal envolvendo 203 fichas de habitantes que procuraram a rede pública de saúde de Araçatuba, São Paulo, Brasil, em 2009, após sofrerem mordedura canina. Mais de 70% dos cães (92/129) eram machos, sendo a maioria (71%) recebida como presente. A busca por companhia foi o principal motivo de aquisição. Houve predomínio do sexo masculino em crianças e do sexo feminino em idosos. A maioria das crianças foi mordida na cabeça/pescoço, e dos adultos, nas mãos/pés e membros inferiores ($p < 0,0001$). O proprietário do animal era conhecido em 83,2% dos casos, sendo indicada apenas observação do cão em 59,4% dos casos. As principais situações que envolveram as agressões foram o cão ter escapado (18,7%) ou permanecer solto na rua (17,0%). A análise de características de cães agressores com informações obtidas junto às suas vítimas e proprietários pode auxiliar a conduta médica nesses casos. Além disso, há necessidade de maior responsabilidade na criação de cães, pois conceitos de posse responsável podem reduzir a ocorrência de mordeduras.

Palavras-chaves: cães, agressão, mordeduras e picadas, raiva, profilaxia pós-exposição.

¹ Professora adjunta da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, da UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, na área de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública

² Pós-Graduando em Ciência Animal – Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP - Univ. Est. Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brasil

DESCRIPCIÓN DE LAS MORDEDURAS POR PERROS DESDE EL PUNTO DE VISTA DEL PERRO AGRESOR Y DE LAS VÍCTIMAS.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar los ataques de perros incluyendo datos sobre el animal y su víctima. Se realizó un estudio exploratorio de corte transversal a partir de las fichas médicas de 203 habitantes que procuraron los servicios de la red pública de salud de Araçatuba, São Paulo, Brasil, después de sufrir mordeduras de perros durante 2009. Más del 70% de los perros (92/129) eran del sexo masculino y la mayoría (71%) fue recibido como regalo. El principal motivo para la adquisición de los animales fue como animal de compañía. Dentro del perfil de personas agredidas, hubo predominio de niños del sexo masculino y de mujeres de edad avanzada. La mayoría de los niños fue mordido en la cabeza / cuello y los adultos en las manos, los pies y en las extremidades inferiores ($p < 0,0001$). El propietario del animal era conocido en el 83,2% de los casos, con la observación de que el perro se indica sólo en el 59,4% de los casos. Los principales escenarios de agresión estuvieron relacionados con el perro escapando de casa (18,7%) o permaneciendo suelto en la calle (17,0%). El análisis de las características de los perros agresores, de las víctimas y de los dueños puede auxiliar en el tratamiento médico en estos casos. Además, existe la necesidad de mayor cuidado en la cría de los perros, dado que el concepto de propiedad responsable puede reducir la prevalencia de mordeduras.

Palabras clave: perros, agresión, mordeduras y picaduras, rabia, profilaxis post-exposición.

INTRODUCTION

Epidemiological studies on the occurrence of dog bites have been conducted in Brazil (1-6) and abroad (7, 8). However, the data recovered from a victim's medical and rabies prophylaxis records contain no information pertaining to the animal aggressors. Some studies discuss the dogs involved in the attack; however, the majority of these studies were conducted outside of Brazil (9-14).

In 2002 the reported number of individuals bitten by dogs in Brazil reached 424,092. Of these, 237,731 individuals required treatment against rabies, resulting in an expense of approximately R\$ 17 million (15).

Between January 1998 and June 2010, 8,283 admissions attributed to incidents involving dog bites were reported in Brazil. Of the 4,747 dog bite incidents that were reported in southeast Brazil, 62.1% occurred within the state of São Paulo. This high prevalence highlights the importance of an epidemiological study of dog bites in São Paulo and of increased prevention efforts for the control of this type of accident (16).

According to Beaver (17), dog aggression is not a final diagnosis, but a behavioral disorder that should be considered according to its causes. The predominant forms of dog aggression include dominance (i.e., competitive aggression), self-defense (i.e., induced by fear or pain), protection of objects or people (i.e., possessive aggression), territorial aggression (i.e., against strangers or unknown dogs), aggression during play, and protection of offspring (i.e., maternal aggression).

The body of literature pertaining to the situational and causal factors of dog bites is also limited (10, 12-14). However, the epidemiological study of aggression in dogs has evolved because of the changing perception towards the importance of understanding the characteristics of the biting dog, in addition to the characteristics of victims.

The objective of this study was to characterize the epidemiological aspects of reported incidents of dog bites in São Paulo, Brazil. We sought to describe incident dog bite cases by victim demographics, biter dog demographics, information pertaining to the acquisition of the dog, the type of aggression, and any situational factors that may have contributed to the dog bite.

METHODS

The study was conducted in the city of Araçatuba, an 1167 km² area of land located in the northwestern region of São Paulo (21°12'41''S 50°25'34''W). In 2009, the estimated population of Araçatuba was 182,204 inhabitants (18).

For this exploratory study, we established a population sample of 203 individuals seeking post-exposure rabies treatment between January and December 2009. Data were obtained after consulting the Epidemiological Surveillance Service of the Health Department of Araçatuba. Information on dog bite victims was obtained from the W64 (CID10) form, an anti-rabies care service within the Information System for Notifiable Diseases (SINAN). Dog bite victims were contacted to complete a closed structured questionnaire administered by two interviewers. Three attempts were made to contact each victim and, if possible, the dog owner. In the event that the dog bite victim or dog owner was unable to be contacted, only the data that were already contained in the SINAN W64 form were recorded.

Evaluation of the 203 W64 forms resulted in 183 interviews with dog bite victims. For 99 of these cases, it was also possible to interview the owner of the biter dog, which in many cases was also the victim, to complete the interview. For 84 cases, it was not possible to contact the owner to obtain more details about the biter dog. For example, the biter dog may have been a stray dog with an unknown owner, or the victim may have been unwilling or unable to recall the address of the owner. In these cases, only basic information was obtained from the victim on the dog bite. Interviews were unable to be conducted for 20 cases. Therefore, only information obtained from the SINAN form was available for analysis for these cases. Reasons for a missing interview included refusal to participate in the study (n=6), inability to contact the victim due to an incorrect address (n=6), the victim moved from the given address (n=2), death of the victim for reasons other than a dog bite (n=2), or lack of response after several attempts of contact (n=4). Due to missing values, the total number of responses for each variable was not constant and did not consistently add up to the total number of records analyzed (n=203).

The research project was submitted and approved by the Ethics Committee of the Faculty of Dentistry of Araçatuba, São Paulo, UNESP (Case FOA-01065/09). Dog owners received an information form about the research objectives and signed a consent form agreeing to participate.

The variables analyzed pertaining to the biter dog included breed, sex, reproductive status, age, size, origin (way of acquiring the dog) and rabies vaccination status. The variable pertaining to the victim or to the dog owner included relation with the dog (e.g., victim, neighbor, stray dog), primary reason for acquiring the dog, sex of the victim, age range of the victim (e.g., child (0-12 years); adolescent (13 to 17 years); adult (18 to 59 years); and elderly (over 60 years)), location of the bite incident (e.g., street, residence), anatomical area affected by the bite of the biter dog, the victim's medical treatment, the situation that triggered the dog bite, provocation of attack, and biter dog aggression type. All information was recorded in a database.

Continuous variables were analyzed using measures of central tendency and dispersion. Categorical variables were analyzed using the Chi-square test or Fisher's exact test, depending on the sample characteristics for each variable. Statistical analyses were performed using BioEstat 5.0 (19).

RESULTS

Mixed-breed dogs were responsible for 58.4% (80/137) of bites, while pedigrees were responsible for 41.6% (57/137) of bites. Of the biter dogs, 19.3% (29/150) were considered large, 46% (69/150) were considered medium, and 34.7% (52/150) were considered to be small.

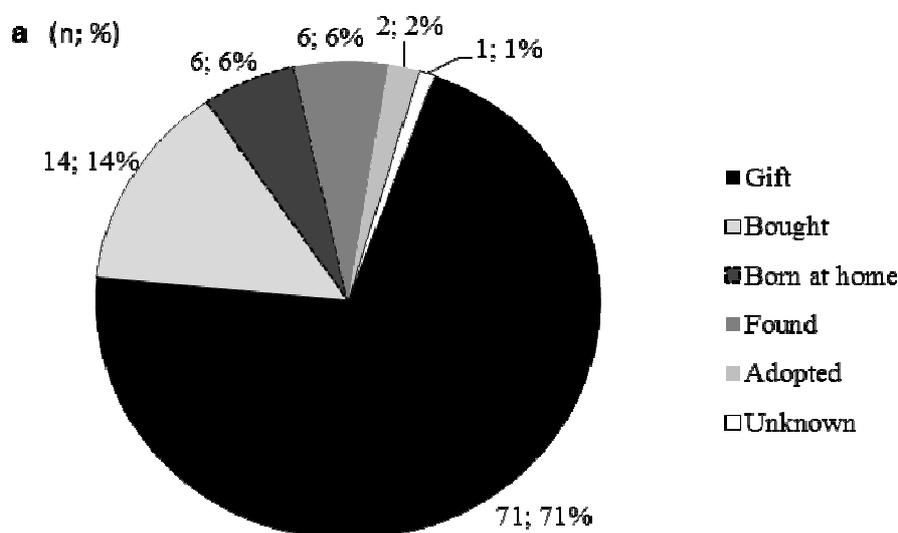
Among the 90 dogs whose age was reported, 48.9% (n = 44) were more than four years old, 36.7% (n = 33) were between one and four years, and 14.4% (n = 13) were less than one year old. The average age among biter dogs was 4.2 years.

Male dogs comprised 71.3% (92/129) of the biter dog population, while 28.7% (37/129) of biter dogs were female. Furthermore, 96.3% (78/81) of male biter dogs were not neutered. Among female biter dogs, 97.1% (34/35) were intact, while only one biter dog was spayed. Statistical analysis using Fisher's exact test showed no association between sex and reproductive status ($p = 0.6494$).

The receipt of puppies as a gift was the main origin, corresponding to 71% (71/100) of the total dogs for which origin was known. Fourteen dogs were purchased (14%), eight dogs were found in the street and subsequently adopted (8%), and six dogs were born to a female dog that had already belonged to the owner (6%). One owner did not know the origin of the dog (Figure 1a). The reason for acquisition of the dog was variable; the most frequently reported reasons for dog acquisition included companionship (n = 61/100; 61%) and protection of the house (n = 25/100; 25%) (Figure 1b).

The average age of the victims was 35.4 years old; ages ranged between one and 96 years old. Approximately half of victims were male (n = 104/203; 51.2%) and half were female (n = 99/203; 48.8%). Using the Chi-square test, the gender of the victims was significantly associated with their age ($p = 0.0431$), indicating that there were a greater proportion of younger males bitten (62.7%) than younger females (37.3%). Similarly, older victims were more likely to be female (n = 22/34; 64.7%) when compared to male victims (n = 12/34; 35.3%).

In children, the predominant areas of the body targeted by bites were head and neck (n = 25/51; 49%) and lower limbs (n = 9/51; 17.6%). In adults and older victims, areas of the body targeted by bites included extremities, including hands and feet (n = 65/139; 46.8%) and the lower limbs (n = 34/139; 38.9%). Age of the victim was significantly associated with the area of the body targeted by bites ($p < 0.0001$) - Figure 2.



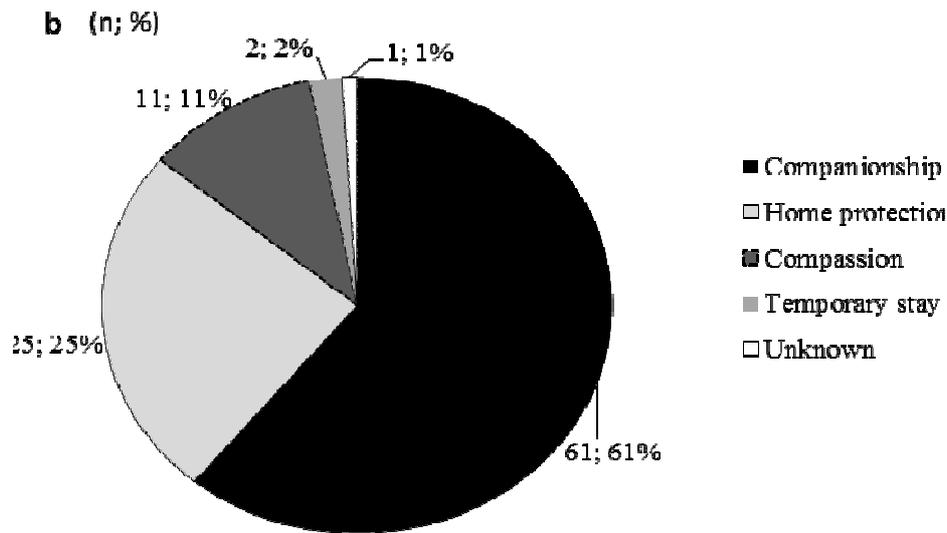


Figure 1. a) Origin of biter dogs in Araçatuba, SP, Brazil, 2009. b) Primary reason for acquiring biter dogs in Araçatuba, SP, Brazil, 2009.

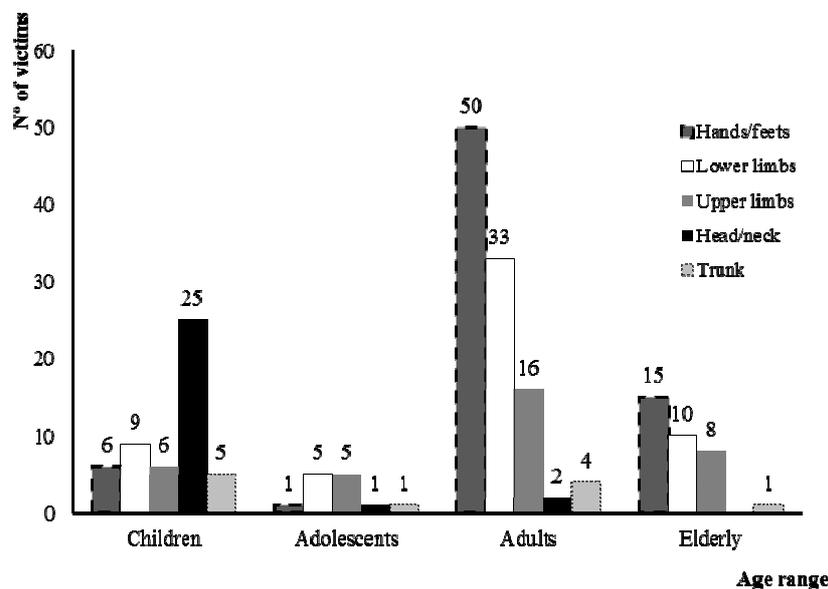


Figure 2. Anatomical areas directly affected by dog bites according to age range of victims in Araçatuba, SP, Brazil, 2009.

The owner of the biter dog was known in 83.2% of bite cases recorded in our study. The most frequently reported owner of the biter dog included a neighbor or the victim, accounting for 26.2% ($n = 50/191$) and 25.7% of cases ($n = 49/191$), respectively. The biter dog belonged to a relative or friend in 16.2% of cases ($n = 31/191$) and was a stray or free roaming animal in 16.7% of cases ($n = 32/191$). Six bites occurred while the victim was working; occupational bites included bites to community health workers, bites to mail delivery employees, bites to individuals leaving brochures through the gate of the dog's household, and bites to employees from a company guard dog.

Approximately half of the aggressions occurred in the residence of the biter dog ($n = 92/186$), while 45.2% ($n = 84/186$) in occurred the street, and 5.4% ($n = 10/186$) occurred in other locations.

The proportion of biter dogs that were vaccinated for rabies was 56% ($n = 94/168$); unvaccinated dogs accounted for 20.2% ($n = 34/168$) of biter dogs, while those with unknown vaccination status accounted for 23.8% ($n = 40/168$) of biter dogs.

When medical treatment of victim is concerned, observation of the biter dog was recommended in 59.4% (n = 120/202) of cases. Rabies vaccination was reported in 30.7% of people (n = 62). Of these, 28 (13.9%) were also responsible for observing the biter dog. Twenty people (9.9%) received rabies vaccine and serum.

The situations that triggered the dog bite can be found in Table 1. The most frequently reported situations included dogs that escaped from their homes (18.6%), dogs that were roaming free in the streets (16.9%), and dogs that attacked without provocation. An act from the victim that resulted in or encouraged the attack by the dog was recognized in 47% (n = 86/183) of cases.

The most frequently reported type of aggression was dominance. A sub-category of dominance included “addicted biter dogs”, defined as dogs that bite as a compulsive behavior (Table 2).

Table 1. Situations that triggered dog bites in Araçatuba, SP, Brazil, 2009.

Situation	N	%
Dog escaped from its home	34	18.6
Dog was roaming free in the streets	31	16.9
Victim approached or enter the territory of the dog	24	13.1
Victim tried to separate a dog fight	15	8.2
Aversive handling by the victim	14	7.7
Victim played with or near the dog	11	6.0
Aggression over food	10	5.5
Victim intentionally hit the dog	7	3.8
Victim unwittingly hit the dog	6	3.3
Feral dog	6	3.3
Victim routinely manitulated the dog	6	3.3
Dog was jealous of a child or another dog	5	2.7
Trying to save injured dog in traffic	5	2.7
Another situation	9	4.9
Total	183	100.0

Table 2. Types of aggression exhibited in biter dogs in Araçatuba, SP, Brazil, 2009.

Type of aggression	N	%
Dominance	90	53.6
Self-defense (i.e. induced by pain or fear)	33	19.6
Territorial	30	17.9
Redirected (i.e. separating dog fight)	13	7.7
Protection (i.e. owner, puppies)	2	1.2
Total	168	100

DISCUSSION

This research identified a higher proportion of dog bites from mixed-breed dogs, a result corroborated by other research findings (12-14, 20). Among the pedigree dogs, the proportion was not detailed due to the potential bias in the information provided by the victim. While some breeds are considered dangerous and regulated by laws in many countries, they are not the most frequently reported dog breeds responsible for attacks and disorders

committed against persons (12, 13, 21). The fact that many breeds are represented by only one individual also makes such analysis difficult (12).

Similar to our findings, attacks by medium to large dogs, compared to small dogs, were the most frequently reported attacks according to Gershman, Sacks and Wright (11), Schalamon et al. (14), Rosado et al. (13), and data obtained from the public health system. This finding, however, may be biased due to the underreporting of small dog attacks. Because small dogs are more likely to inflict only minor damage, attacks by small dogs are less likely to be reported and therefore may be underestimated (12). In this study, few biter dogs were less than one year old. A previous study conducted in Araçatuba, São Paulo (22), found that 45.5% of biter dogs sent for rabies diagnosis were less than one year old, while only 20.3% were over four years old. However, during that study period, an outbreak of rabies occurred in the study area (1993-1997). Therefore, any animal that had attacked a person during this time was submitted for rabies diagnosis. Because biting is a normal behavior for dogs less than one year old, especially when playing, it is possible that people do not find it important to seek medical care after being bitten by a dog less than one year old in the absence of a rabies outbreak.

The predominance of males among biter dogs in our study is consistent with the previous study conducted in the same geographic region, where 68.4% of biters were male dogs (22). The results of this study also agree with those published by Gershman et al. (11), who found higher rates of aggression by intact male dogs compared to female or neutered dogs in the United States. In other countries, however, research shows most aggressive dogs are neutered (12, 20, 23). This may be related to cultural and socio-economic differences between countries. For example, Brazil may not yet be able to afford or prioritize the sterilization of pets to preserve the health of humans and animals.

Similar to the present paper, the municipal kennel of Ibiúna, São Paulo (24), also found that the most common routes of dog acquisition were to receive the pet as a gift, to purchase it, or to find the abandoned animal on public streets. When the animal was purchased, the majority of participants indicated that the animal was under his or her care to provide security or company for the family. Approximately 90% of dog adoptions in the kennel occurred because the person enjoyed and sought the company of animals (25). Similar reasons have been identified for the replacement of dogs in homes that previously had a dog euthanized due to a leishmaniasis outbreak that had recently occurred in the municipality of Araçatuba (26). Acquisition of animals that do not involve planning and agreement between all family members, such as the acceptance of animals as a gift, can increase the abandonment of dogs. Abandoned dogs are often not taken to the municipal kennels, but are set loose on the streets, increasing the risk of dog bites to people by stray dogs.

Studies conducted by Guy et al. (12) and Cornelissen and Hopster (10) indicate that adults were the most frequently reported victims of a dog attack. In addition, males have been identified in several other studies as the most common gender affected by animal attacks (1-5, 10, 27, 28). In this study, males were more frequently reported as victims of dog bites among children and adolescents, similar to findings reported in Brazil (3, 4, 6) and other countries (7, 13, 14, 27). Garcia et al. (4), Alonso (5), Frias, Lages and Carvalho (6), have attributed this fact to a growing percentage of children living with animals and increased activity between children and dogs that includes rough games, especially among boys. According to our records, some children who suffered bites had intentionally hit the dog while playing.

Among adults and the elderly, a greater proportion of victims were female, as also observed in age groups described by Carvalho, Soares and Franceschi (1), Frias, Lages and Carvalho (6). According to Frias, Lages and Carvalho (6), adult or elderly women may spend more time at home, thereby increasing exposure to potential dog bites from their own dogs.

In our study, children were most frequently bitten in the head and neck, while adults and elderly were most frequently bitten in the extremities. This may be due to the difference in

height between age groups and increased defense capabilities of adults. The high prevalence of head and neck bites among children and extremities/limb bites among adolescents and adults are widely reported within the scientific literature (3, 4, 10, 13, 14).

One important factor we analyzed was the familiarity between the victim and the biter dog or biter dog's owner. In our study, we found 83.2% of dog bite victims knew either the biter dog or the biter dog's owner. This data varies considerably within the literature, and ranges from 71% to 88.5% (2, 14, 21, 22, 27). A victim that is familiar with the biter dog or biter dog's owner may have easier access to information regarding the vaccination history and health condition of the biter dog, which can directly influence rabies post-exposure treatment during medical care.

The percentage of victims bitten by their own dogs was similar to that observed by other authors. Schalamon et al. (14) found that 24% of victims were bitten by their own dogs, while 34% of victims were bitten by a dog belonging to a friend or relative. Fatjó et al. (20) reported that 38.5% of victims were bitten by their own dog, while Cornelissen and Hopster (10) found that only 28% of victims were bitten by their own dog. The highest percentage of victims who were bitten by their own dog was reported in a study conducted by Rosado et al. (13), in which 57% of biter dogs belonged to the immediate family of the victim, 28% to a neighbor, 12% to a relative, 3% to a friend, while 12% were stray dogs.

Approximately half of the dog bites examined in this study occurred within the residence that the biter dog lived (92/186), while 45.2% occurred in the streets, and 5.4% (10/186) occurred in other places. An increased number of dog bites in the household of the biter dog was reported in the state of São Paulo (4, 28) and in other countries, including the United States (9, 23), Thailand (8), Belgium (21) and the Netherlands (10).

Due to the lack of information contained in the SINAN records in Brazil, the analysis of rabies prophylaxis typically does not include variables related to the biter dog and the environment where the aggression took place, Rigo and Honer (29) and Fortes et al. (3) warn about the lack of such information, and suggest the inclusion of a new field in the SINAN records that describe the owner or the ownership condition of biter dogs.

According to the owners, 56% of biter dogs had a current rabies vaccination. This percentage is far below the Ministry of Health's goal to have 80% of dogs vaccinated in Brazil and is considered unsatisfactory. Other studies have identified that between 34.2% and 67.5% of biter dogs are vaccinated in Brazil (1, 4, 6, 22). Research conducted in other countries has also reported low rates of vaccination (8, 27).

In the cases where the victim requires medical treatment, the percentage of animals placed under rabies observation (59.4%) was similar to the studies of Garcia et al. (4) in São Paulo (50.6%) and Carvalho et al. (1) in Maringá, PR (59.1%). In Brazil, the highest rate of indication for treatment (91.3%) was reported in Araraquara, SP (5); the highest rate (81.6%) of post-exposure vaccination in Brazil was reported in Jaboticabal (6), which also reported the lowest proportion of animal observation (18.4%). However, the proportion of rabies serum indicated in the present study (9.9%) was higher than previously reported (1, 6, 28, 29).

Surveys in other countries reported that the situation that triggered the dog bite was often related to the interaction with the animal, including children playing with dogs or aversive handling, such as medication, vaccination, and cleaning ears, among others (13, 14, 20, 27). The results of these studies corroborate our findings in the present paper, in which we acknowledge the responsibility of the victim in nearly half of all cases.

Dominance aggression is the most common form of aggression (17), as verified in this study. A similar result was observed by Guy et al. (12) in Canada, where the majority of bites was due to dominance, followed by situations involving child games. It is important to know the circumstances that involve animal bites and to characterize the most common types of aggressive behavior. This information can be used to educate the population, establish prevention programs, and reduce the number of dog bites in the city.

We conclude that the analysis of the biter dogs, using information obtained from the owners' questionnaires, makes it possible to considerably expand the data extracted from the SINAN form. Therefore, we suggest that additional fields be added to the SINAN forms that pertain to biter dog characteristics. At the very least, inquiries pertaining to biter dog characteristics should be made by hospital employees and recorded in the "observations" field that is currently on the SINAN form. These actions will not only assist the course of medical treatment required as a result of the attack, but will also benefit future epidemiological studies and educational activities that target the population of dog bite victims.

Because pet dogs that had access to the streets were the most frequent aggressors in our study, we also conclude that there is a need for greater responsibility in raising dogs. In addition, many situations that resulted in dog bites could have been prevented if the principles of responsible ownership were followed, such as not interfering with eating, not separating dogfights, and not beating dogs.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Municipal Health Department of Araçatuba for promptly providing the data needed to write the paper. To FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for the Master fellowship to Daniel S. Buso (Proc. 2008/07642-0).

REFERENCES

1. Carvalho WO, Soares DFPP, Franceschi VCS. Características do atendimento prestado pelo serviço de profilaxia da raiva humana na rede municipal de saúde de Maringá-Paraná, no ano de 1997. *Inf Epidemiol SUS*. 2002;11:25-35.
2. Del Ciampo LA, Ricco RG, Almeida CAN, Bonilha LRCM, Santos TCC. Acidentes de mordeduras de cães na infância. *Rev Saude Publica*. 2000;34:411-2. doi: 10.1590/S0034-891000000400013.
3. Fortes FS, Wouk AFPP, Biondo AW, Barros CC. Acidentes por mordeduras de cães e gatos no município de Pinhais, Brasil de 2002 a 2005. *Arch Vet Sci*. 2007;12:16-24.
4. Garcia RCM, Vasconcelos SA, Sakamoto SM, Lopez AC. Análise de tratamento anti-rábico humano pós-exposição em região da Grande São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica* 1999;33:295-301. doi: 10.1590/S0034-89101999000300011.
5. Alonso BPM. Estudo dos casos de agressões por cães no município de Araraquara, estado de São Paulo, Brasil [monografia]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2005.
6. Frias DFR, Lages SLS, Carvalho AAB. Avaliação da conduta de profilaxia antirrábica indicada para pessoas envolvidas em agravos com cães e gatos no município de Jaboticabal, SP, no período de 2000 a 2006. *Rev Bras Epidemiol*. 2011;14:722-32.
7. Aghahowa SE, Ogeboven RN. Incidence of dog bite and anti-rabies vaccine utilization in the, University of Benin Teaching Hospital, Benin City, Nigeria: a 12-year assessment. *Vaccine*. 2010;28:4847-50.
8. Sriaroon C, Sriaroon P, Daviratanasilpa S, Khawplod P, Wilde H. Retrospective: animal attacks and rabies exposures in Thai children. *Travel Med Infect Dis*. 2006;4:270-4. doi: 10.1016/j.tmaid.2005.06.001.

9. Bernardo LM, Gardner MJ, Amon N. Dog bites in children admitted to Pennsylvania Trauma Centers. *Int J Trauma Nurs*. 1998;4:121-7. doi: 10.1016/S1075-4210(98)90001-3.
10. Cornelissen JMR, Hopster H. Dog bites in The Netherlands: a study of victims, injuries, circumstances and aggressors to support evaluation of breed specific legislation. *Vet J*. 2010;186:292-8. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.10.001.
11. Gershman KA, Sacks JJ, Wright JC. Which dogs bite? A case-control study of risk factors. *Pediatrics*. 1994;93:913-7.
12. Guy NC, Luescher UA, Dohoo SE, Spangler E, Miller JB, Dohoo IR, et al. A case series of biting dogs: characteristics of the dogs, their behaviour and their victims. *Appl Anim Behav Sci*. 2001;74:43-57. doi: 10.1016/S0168-1591(01)00155-1.
13. Rosado B, García-Belenguer S, Léo M, Palacio J. A comprehensive study of dog bites in Spain, 1995–2004. *Vet J*. 2009;179:383-91. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.02.002.
14. Schalamon J, Ainoedhofer H, Singer G, Petnehazy T, Mayr J, Kiss K, et al. Analysis of dog bites in children who are younger than 17 years. *Pediatrics*. 2006;117:374-9. doi: 10.1542/peds.2005-1451.
15. Belotto AJ. Criando um amigo. Manual do educador. Manual de prevenção contra agressões de cães e gatos. São Paulo: Secretaria Municipal de Saúde. Gerência de Vigilância Ambiental. Centro de Controle de Zoonoses; 2004.
16. Ministério da Saúde [Internet]. Datasus: informações de saúde. Epidemiológicas e morbidade. Morbidade hospitalar. Causas externas, por local de internação. 2010 [acesso em 2010 Set 07]. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>
17. Beaver BV. Canine behaviour: insights and answers. 2ª ed. Missouri: Saunders Elsevier; 2009.
18. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. Banco de dados: Cidades. 2010 [acesso em 2010 Set 14]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat>
19. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AAS. BioEstat aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. 5ª ed. Belém: Ong Mamirauá; 2007.
20. Fatjó J, Amat M, Mariotti VM, Torre JLR, Manteca X. Analysis of 1040 cases of canine aggression in a referral practice in Spain. *J Vet Behav*. 2007;2:158-65. doi: 10.1016/j.jveb.2007.07.008.
21. De Keuster T, Lamoureaux J, Kahn A. Epidemiology of dog bites: a belgian experience of canine behavior and public health concerns. *Vet J*. 2006;172:482-7. doi: 10.1016/j.tvjl.2005.04.024.
22. Buso DS, Nunes CM, Queiroz LH. Características relatadas sobre animais agressores submetidos ao diagnóstico de raiva, São Paulo, Brasil, 1993-2007. *Cad Saude Publica*. 2009;25:2747-51. doi:10.1590/S0102-311X2009001200021.
23. Reisner IR, Shofer FS, Nance ML. Behavioral assessment of child-directed canine aggression. *Inj Prev*. 2007;13:348-51. doi: 10.1136/ip.2007.015396.

24. Soto FRM, De Souza AJ, Pinheiro SR, Risseto MR, Bernardi F, Shimozako HJ, et al. Motivos do abandono de cães domiciliados para eutanásia no serviço de controle de zoonoses do município de Ibiúna, SP, Brasil. *Vet Zootec.* 2007;14:100-6.
25. Soto FRM, De Sousa AJ, Risseto MR, Lima BFMS. Adoção de cães no município de Ibiúna-SP-Brasil: análise crítica. *Rev Cienc Ext.* 2006;3:26-35.
26. Andrade AM, Queiroz LH, Nunes GR, Perri SHV, Nunes CM. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40:594-5. doi: 10.1590/S0037-86822007000500021.
27. Patrick GR, O'Rourke KM. Dog and cat bites: epidemiologic analyses suggest different prevention strategies. *Public Health Rep.* 1998;113:252-7.
28. Pinto CL, Alleoni ES. Aspectos da vigilância epidemiológica da raiva em sub-regiões administrativas do Estado de São Paulo, Brasil, 1982-1983. *Rev Saude Publica.* 1986;20:288-92. doi: 10.1590/S0034-89101986000400004.
29. Rigo L, Honer MR. Análise da profilaxia da raiva humana em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, em 2002. *Cad Saude Publica.* 2005;21:1939-45. doi:10.1590/S0102-311X2005000600044.

Recebido em: 23/08/12

Aceito em: 03/10/12

IMPLICAÇÕES DO USO DO EXTRATO DE LBD (LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE) OU DA GEMA DE OVO “PURIFICADA”, SOBRE A MOTILIDADE E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA NO SÊMEN OVINO REFRIGERADO POR 24 OU 48 HORAS

Marcel Barbosa Falleiros¹
Sony Dimas Bicudo²
Leandro Rodello¹
Claudia Dias Monteiro¹
Sabrina Missae Sakashita¹
Romildo Romualdo Weiss³

RESUMO

Objetivou-se estudar os efeitos da substituição da gema de ovo *in natura* pela gema de ovo “purificada” (Gp) ou pelo extrato de lipoproteína de baixa densidade (LBD) em meios diluidores, sobre a motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), retenção acrossomal (RA) e o percentual de cauda espermática dobrada (CED), de sêmen ovino refrigerado. Vinte ejaculados, de 5 carneiros da raça Dorper foram diluídos em meios Glicina Gema Leite (GGL - controle), Glicina Gema “purificada” Leite (GGpL) ou Glicina Extrato Leite (GEL), refrigerados por 24 ou 48 horas e submetidos à teste de exaustão de 120 minutos. Análise da MT e MP foi realizada em HTMA (IVOS 12) em cinco momentos: M0 - imediatamente após a diluição, M1 e M3 - após a refrigeração por 24 ou 48 horas respectivamente; M2 e M4 - após refrigeração de 24 ou 48h e incubação por 120 minutos a 37°C. Em microscopia de contraste de fase, empregando-se preparações úmidas com solução de glutaraldeído, avaliou-se a RA e o percentual de CED nos momentos M0 ao M4. A MT não foi influenciada pelo tempo de refrigeração independente do meio utilizado ($P>0,05$), porém declinou ($P<0,05$) após a refrigeração/exaustão (M2 e M4). A MP declinou em 48h de refrigeração independente do meio utilizado, obtendo-se melhores resultados no meio GEL, neste momento (M3), em relação ao controle ($P<0,05$). A exaustão também fez diminuir a MP após os dois tempos de refrigeração, porém no M2 o meio GGpL apresentou valor superior em relação ao controle ($P<0,05$). O processo de refrigeração e incubação pós-refrigeração não depreciou substancialmente a qualidade da morfologia espermática, sendo que em nenhum dos momentos as médias da RA foram inferiores a 93,8% e as da CED superiores a 5,4%. Os meios GGpL e GEL preservaram inalterada a RA durante a refrigeração por 24 ou 48 horas. Houve declínio da RA após a exaustão (M2 e M4, $P<0,05$), porém o meio GGpL apresentou melhor desempenho no M4 ($P<0,05$). Não houve efeito do meio sobre a ocorrência de CED, entretanto o GGpL preveniu o aumento do dobramento de cauda espermática em todos os momentos estudados. Conclui-se ser possível a substituição da gema de ovo *in natura* pela Gp ou pelo extrato de LBD no meio GGL para a refrigeração do sêmen ovino por até 48 horas, sem prejuízos aos parâmetros espermáticos de motilidade e morfologia.

Palavras-chave: lipoproteínas de baixa densidade; ovino; sêmen refrigerado.

¹ Pós-graduando, DRARV- FMVZ – UNESP, Botucatu-SP Marcel Barbosa Falleiros. Rua Adolpho César, 217, 18608-780, Jd. Eldorado, Botucatu-SP, Fone:(14) 81315778.

² Docente, DRARV – FMVZ – UNESP, Botucatu-SP.

³ Docente, DRA – UFPR – Curitiba-PR.

IMPLICATIONS OF THE USE OF EXTRACT LDL (LOW DENSITY LIPOPROTEIN) OR THE EGG YOLK "PURIFIED" ON MOTILITY AND MORPHOLOGY IN OVINE SEMEN COOLED TO 24 OR 48 HOURS

ABSTRACT

The objective was to study the effects of substitution of fresh egg yolk for egg yolk "purified" (EYp) or the extract of low-density lipoprotein (LDL) in extenders on the total motility (TM) and progressive motility (PM), acrosomal retention (AR) and the percentage of sperm tail folded (STF) in sheep semen cooled. Twenty ejaculates from five Dorper sheep were diluted in extender Glycine Yolk Milk (GGL - control), Glycine "purified" Yolk Milk (GGpL) or Glycine Extract Milk (GEL), cooled for 24 or 48 hours and subjected to the test depletion of 120 minutes. Analysis of TM and PM was held in HTMA (IVOS 12) in five moments: M0 - immediately after dilution, M1 and M3 - after refrigeration for 24 or 48 hours respectively, M2 and M4 - after 24 or 48 hours of cooling and incubation for 120 minutes at 37°C. In microscopy of phase contrast, using wet preparations with glutaraldehyde, we assessed the RA and the percentage of the STF at M0 to M4. TM was not affected by chilling time regardless of medium used ($P>0.05$), but declined ($P<0.05$) after the cooling / exhaust (M2 and M4). The PM declined by 48 hours regardless of the cooling extender used, obtaining better results using GEL, at the moment (M3), compared to control ($P<0.05$). The exhaust also decreased the PM after two moments of refrigeration, but in the middle GGpL in M2 showed a value higher than the control ($P<0.05$). The process of cooling and incubation post-cooling is not depreciated substantially the quality of sperm morphology, and in any of the times the mean RA was less than 93.8% and of the STF above 5.4%. The extenders GEL and GGpL preserved unchanged the RA during cooling for 24 or 48 hours. There was a decline after the exhaustion of RA (M2 and M4, $P<0.05$), but the extender GGpL performed better on the M4 ($P<0.05$). There was no effect of environment on the occurrence of STF, however the GGpL prevented the increase of the bending of sperm tails at all times studied. Then it's possible to replace the fresh egg yolk by the EYp or the extract of LDL in the extender for cooling GGL sheep semen for up to 48 hours, without altering the parameters of sperm motility and morphology.

Keywords: low density lipoprotein; ram; cooling semen.

IMPLICACIONES DEL USO DE EXTRACTO LBD (LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD) O DE YEMA DE HUEVO "PURIFICADA" EN LA MOTILIDAD Y MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA DEL SEMEN OVINO REFRIGERADO DURANTE 24 O 48 HORAS

RESUMEN

El objetivo fue estudiar los efectos de la sustitución de la yema de huevo fresco por la yema de huevo "purificada" (YHp) o el extracto de la lipoproteína de baja densidad (LBD) en los diluyentes, sobre la motilidad total (MT) y la motilidad progresiva (MP), la retención acrosomal (RA) y el porcentaje de cola espermática plegado (CEP) en el semen ovino refrigerado. Veinte eyaculados de cinco carneros raza Dorper fueron diluidos en los medios Glicina Yema Leche (GGL - control), Glicina Yema purificado Leche (GGpL) y Glicina Extracto Leche (GEL), refrigerado por 24 o 48 horas y sometidos a la prueba de agotamiento por 120 minutos. El análisis de MT y MP se llevó a cabo en HTMA (IVOS 12) en cinco momentos: M0 - inmediatamente después de la dilución, M1 y M3 - después de la refrigeración durante 24 o 48 horas, respectivamente, M2 y M4 - después de 24 o 48 horas de

refrigeración y la incubación durante 120 minutos a 37°C. En la microscopía de contraste de fase, utilizando preparaciones en fresco con glutaraldehído, se evaluó la RA y el porcentaje de la CEP de M0 a M4. La MT no se vio afectada por el tiempo de refrigeración, independientemente del medio utilizado ($P>0,05$), pero se redujo ($P<0,05$) posterior al periodo de refrigeración/agotamiento (M2 y M4). La MP declinó a las 48 horas, independientemente del medio de refrigeración utilizado, obteniéndose mejores resultados con el uso de GEL, en el momento (M3), en relación con el control ($P<0,05$). El agotamiento también redujo el MP después de dos tiempos de refrigeración, pero en el M2, el medio de GGpL mostró un valor más alto que el de control ($P<0,05$). El proceso de refrigeración y la incubación después de la refrigeración, no disminuyó sustancialmente la calidad de la morfología de los espermatozoides, y en ninguna de las veces la media de RA fue inferior al 93,8% y de la CEP, superior a 5,4%. Los medios de GEL y GGpL conservan la RA sin cambios durante el enfriamiento de 24 o 48 horas. Se observó una disminución después del agotamiento de la RA (M2 y M4, $P<0,05$), pero el medio GGpL presentó mejores resultados en el M4 ($P<0,05$). No hubo efecto del medio sobre la incidencia de la CEP, sin embargo, el GGpL impidió el aumento de la curvatura de la cola de los espermatozoides en todo los momentos estudiados. Se concluye, que es posible sustituir la yema de huevo fresca por la yema de huevo purificada o el extracto de LBD en el medio GGL para la refrigeración de semen ovino para un máximo de 48 horas, sin alterar los parámetros de motilidad y la morfología espermática.

Palabras clave: lipoproteínas de baja densidad; ovino; semen refrigerado.

INTRODUÇÃO

Com o aumento na demanda por carne de qualidade, a criação de ovinos se tornou uma alternativa de ganho extra para os produtores. Visando viabilizar economicamente essa produção é necessário um incremento no manejo reprodutivo, buscando um melhor aproveitamento do potencial produtivo das matrizes e reprodutores.

As biotécnicas envolvendo a manipulação do sêmen vêm se aprimorando, e proporcionando a utilização de reprodutores geneticamente superiores em um maior número de matrizes durante o período de estação de monta, a partir da expansão do ejaculado com meio diluidor, e a utilização de técnicas de inseminação artificial.

O meio diluidor exerce importante papel no processo da preservação dos espermatozoides. Nas últimas décadas, dezenas de formulações de meios diluidores têm sido propostas e vários tipos de substâncias crioprotetoras foram incorporados em suas composições. As substâncias, com reconhecida ação crioprotetora, atualmente mais utilizadas são a gema de ovo e o glicerol.

Devido seu efeito benéfico sobre a conservação de espermatozoides, a incorporação de gema de ovo (1,5 a 50%) aos diluidores é de uso consagrado sendo o constituinte mais prevalente em boa parte das formulações. A gema de ovo associada a outros ingredientes previne o choque térmico, preserva a motilidade e a integridade das membranas plasmática e acrossomal (1). Atua também, como um protetor osmótico, permitindo uma maior tolerância dos espermatozoides a soluções hipo e hiperosmóticas. A proteção que exerce durante a criopreservação se deve a sua aderência à membrana plasmática, especialmente dada pela fração das lipoproteínas de baixa densidade (LBD) (2, 3).

Porém, nos últimos anos a sua utilização tem sido questionada devido à variabilidade na composição e risco sanitário em veicular agentes microbiológicos específico para regiões isenta, conseqüente à deficiente rastreabilidade de sua origem. Há também um constante risco potencial de contaminação por micro-organismos como bactérias e micoplasmas, que podem

acarretar na geração de endotoxinas deletérias à capacidade fertilizante do espermatozoide (4, 5).

Várias técnicas de refrigeração são empregadas utilizando-se geladeira e containers de transporte. Com isso, surgiu a necessidade de aprimorar e testar meios diluidores para preservar os espermatozoides, por um maior período de tempo, mantendo a motilidade, a integridades das membranas e sua capacidade fertilizante.

Neste contexto, propõe-se avaliar a utilização do extrato de lipoproteínas de baixa densidade (LBD) e da gema de ovo “purificada”, como constituintes de meios diluidores utilizados na refrigeração do sêmen ovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP.

Foram selecionados por meio de exame andrológico 5 carneiros da raça Dorper com idade entre 1 e 4 anos. Todos os animais foram pesados (51 Kg a 100 Kg), vermifugados e mantidos, durante o período experimental, sob as mesmas condições de instalações, alimentação e manejo.

Delineamento experimental

O sêmen foi colhido por meio de vagina artificial aquecida a 42°C com copo coletor graduado pré-aquecido a 37°C. Foram colhidos 4 ejaculados de cada carneiro, perfazendo um total de 20 amostras. Após análise em suas características macro e microscópicas as amostras foram diluídas, nos três meios diluentes, constituindo-se assim os três tratamentos experimentais pareados com a seguinte denominação:

GGL – Fração diluída em meio Glicina Gema Leite e considerada como controle dos demais tratamentos;

GGpL – Fração diluída em meio Glicina Gema “purificada” Leite;

GEL – Fração diluída em meio Glicina Extrato Leite.

Para cada tratamento foram constituídas duas alíquotas a fim de serem refrigeradas por 24 horas ou 48 horas, perfazendo-se então seis alíquotas para cada coleta. Ao final do período de refrigeração (24 ou 48 horas), um conjunto de alíquotas representando cada tratamento, foi destinado ao Teste de Exaustão com duração de 120 minutos.

Em cada uma dessas etapas o sêmen foi avaliado quanto às características de cinética e morfologia espermáticas constituindo-se cinco conjuntos de análises de acordo com o momento de sua realização:

M0 – (Momento 0): imediatamente após a adição dos meios diluidores;

M1 – (Momento 1): após refrigeração por 24 horas;

M2 – (Momento 2): após refrigeração por 24 horas, e com 120 minutos do teste de exaustão;

M3 – (Momento 3): após refrigeração por 48 horas;

M4 – (Momento 4): após refrigeração por 48 horas, e com 120 minutos do teste de exaustão.

Confecção dos meios diluentes

Falleiros MB. et al. Implicações do uso do extrato de LBD (lipoproteínas de baixa densidade) ou da gema de ovo “purificada”, sobre a motilidade e morfologia espermáticas no sêmen ovino refrigerado por 24 ou 48 horas. Vet. e Zootec. 2013 jun.; 20(2): 307-317.

Foram confeccionados três meios com base no diluente Glicina Gema Leite, isentos de glicerol (6) sendo na formulação original empregada a gema de ovo *in natura* (20%), constituindo-se o controle GGL, e os outros dois denominados meio Glicina Gema “purificada” Leite (GGpL) pela substituição do constituinte gema de ovo pela gema de ovo “purificada” na formulação e meio Glicina Extrato Leite (GEL) pela substituição do constituinte gema de ovo pelo extrato de LBD na formulação.

Foram coletadas as gemas de dez ovos frescos provenientes de galinhas criadas e mantidas em sistemas de produção segundo o conceito *orgânico* e com alimentação variada. Os ovos foram quebrados manualmente sendo separada a gema do albúmen. Para total remoção da chalaça e dos restos de albúmen impregnados na membrana vitelínica, as gemas foram cuidadosamente roladas em papel filtro. Seu conteúdo foi coletado em um Becker mantido em gelo, formando um *pool* de aproximadamente 150 mL e dividido em 3 frações para confecção dos meios GGL, GGpL e GEL.

Purificação da gema de ovo

A purificação foi feita tendo como base alguns passos da extração das LBD, com o objetivo de remoção por centrifugação e diálise, de grumos, partículas sólidas e eletrólitos presentes na gema de ovo *in natura*.

Parte do *pool* das gemas de ovo, foi separada, e diluída 1:1 em solução salina isotônica (0,17M NaCl) e homogeneizada por uma hora em agitador vortex sob refrigeração a 4°C, sendo em seguida centrifugada (**1^acent.**) a 10.000 x g por 45 minutos à 4°C e o sobrenadante centrifugado novamente (**2^acent.**), para remoção completa dos grânulos. Após as centrifugações, o sobrenadante foi dialisado por um período mínimo de 8 horas tendo como eluente a água destilada, em reservatório de troca de 1000 mL, num sistema de fluxo contínuo, com volume de troca de 125 mL/hora e em temperatura controlada entre 4 e 5,5°C. Foi utilizada membrana de celulose regenerada, com tamanho de 33x21mm, de peso molecular de 12.000-16.000 e porosidade de 25 angstroms (INLAB Diagnóstica – Cód. 133 – Diadema – SP). Cada membrana tinha capacidade máxima, calculada conforme dimensões, de 90 mL. Observava-se o máximo preenchimento da membrana para minimizar a entrada de eluente, evitando-se a diluição da solução. Após a diálise foi realizada nova centrifugação (**3^acent.**) por 45 minutos a 10.000 x g sob refrigeração a 4°C. O sobrenadante “purificado” foi coletado e armazenado no freezer de -20°C em tubos tipo Falcon de 50 mL, para posterior confecção do meio GGpL.

Extração das LBD

A extração das LBD foi realizada seguindo o método descrito por Moussa et al. (2). Para isto, a gema de ovo foi diluída 1:1 com solução salina isotônica (0,17M NaCl) e homogeneizada por uma hora em agitador vortex, e sob refrigeração a 4°C., em seguida centrifugada (**1^acent.**) por 45 minutos à 4°C por 10.000 x g e o sobrenadante centrifugado novamente (**2^acent.**) por igual tempo, intensidade e temperatura, para remoção completa dos grânulos. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônia saturado (40%) e o pH ajustado para 8,7 com solução de hidróxido de sódio (NaOH - 0,1M), homogeneizado por uma hora sob refrigeração (4°C). Na sequência a solução foi centrifugada (**3^acent.**) a 10.000 x g por 45 minutos à 4°C, sendo o sobrenadante coletado e dialisado conforme descrito no processo de “purificação”. Após a diálise, foi realizada a última centrifugação (**4^acent.**), novamente a 10.000 x g por 45 minutos e o sobrenadante residual, rico em LBD foi coletado. O extrato foi então acondicionado em tubos tipo Falcon de 50 mL, armazenados em freezer de -20°C, para posterior confecção do meio GEL.

Análise da motilidade e morfologia espermática

A análise das motilidades foi realizada utilizando-se Hamilton Thorn Motility Analyser – HTMA (IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA) em câmara de Makler a 37°C. Avaliou-se em três campos, o primeiro escolhido pelo operador e outros dois aleatórios, os parâmetros (7):

- **MT** - Motilidade total (%);
- **MP** - Motilidade progressiva (%).

Para a análise da morfologia espermática foram diluídos 10 µL de sêmen de cada alíquota, em 500 µL de solução de Glutaraldeído a 0,2% aquecida a 37°C. A preparação foi acondicionada em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL. As análises foram realizadas em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x sob imersão por meio de preparações úmidas, classificando duzentas células por preparação (8). Nas análises dos dados, foram consideradas a retenção acrossomal (RA%) e o percentual de cauda espermática dobrada (CED%).

Diluição do sêmen

O volume ejaculado foi determinado pela graduação do copo coletor e 10 µL de sêmen foram diluídos em 4 mL de água destilada (taxa de diluição de 1:400 – volume:volume – v:v) para determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer.

Determinada a concentração espermática, as amostras foram diluídas na proporção final de 1×10^8 espermatozoides/100 µL, nos três meios, em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 600 µL, de tal maneira a ocupar a capacidade máxima do recipiente, minimizando a presença de ar. Para cada meio foram constituídas duas alíquotas a serem refrigeradas por 24 ou 48 horas.

Antes do início da refrigeração, os microtubos com o sêmen diluído foram mantidos em bloco térmico a 37°C, e de cada alíquota foi tomada uma amostra de 10 µL e diluída na proporção 1:20 (v:v) numa solução de X-Cell[®] (IMV Thechnologies (IMV), França) para realização das análises da motilidade e morfologia espermática (**M0**).

Refrigeração do sêmen e teste de exaustão

As alíquotas foram transferidas a um dispositivo para refrigeração com capacidade para 12 microtubos (2 carneiros, 6 amostras cada um), que havia sido mantido em estufa a 37°C (9). O conjunto foi então levado à geladeira (Minitüb 518C[®] - Minitüb do Brasil Ltda), à 5°C, por até 48 horas.

As amostras destinadas a análise e teste de exaustão, após 24 horas de refrigeração, foram retiradas todas de uma só vez, reduzindo-se assim o tempo de abertura da geladeira e evitando-se o risco de elevação da temperatura interna. Estas foram transferidas para microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL, aquecidas e estabilizadas em bloco térmico à 37°C, sendo acrescido 30% do meio diluente original à alíquota inicial em cada tratamento (GGL, GGpL e GEL) (10). A seguir realizou-se uma diluição de 1:20 (v:v) em solução X-Cell[®] para proceder-se as análises computadorizada da motilidade e morfologia espermática de tratamento (**M1**).

As alíquotas foram submetidas ao teste de exaustão no bloco térmico a 37°C durante 120 minutos sendo repetidas as análises aos 120 minutos (**M2**) da incubação (8).

Os mesmos procedimentos e análises foram realizados após 48 horas de refrigeração (**M3**) e durante o teste de exaustão (120 minutos – **M4**).

Análise estatística

Como havia interesse em se comparar os tratamentos e os momentos, os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com três tratamentos (GGL, GGpL e GEL), cinco momentos (**M0 a M4**) e cinco blocos (carneiros). Para a análise dos dados utilizaram-se as médias dos valores obtidos das quatro amostras. As variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, sendo utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5% (11). Foi utilizado o programa SPSS 16.0 para *software* Windons[®] (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, os vinte ejaculados obtidos dos 5 carneiros apresentaram volume médio de $1,41 \pm 0,26$ mL e uma concentração média de $4,71 \pm 1,08 \times 10^9$ espermatozóides/mL. O sêmen utilizado encontrava-se dentro dos padrões da espécie, pois segundo Henry e Neves (12) e Karagiannidis et al. (13), o volume médio do ejaculado ovino é de aproximadamente 0,7 a 2 mL e para Boundy (14) a concentração espermática é de 3,5 a $6,0 \times 10^9$ espermatozóides/mL.

O procedimento de diluição na solução de X-Cell[®] fez-se necessário pela alta concentração espermática das amostras, que inviabiliza a análise computadorizada devido ao cruzamento das trajetórias dos espermatozóides (15).

Os valores médios e respectivos desvios padrão das MT e MP após as diluições nos meios Glicina Gema Leite (GGL), Glicina Gema purificada Leite (GGpL) e Glicina Extrato Leite (GEL), após a refrigeração e teste de exaustão, são apresentados na Tabela 1.

A MT não diferiu ($P > 0,05$) após refrigeração de 24 e 48 horas em relação ao momento imediatamente após a adição dos meios diluidores, em nenhum dos tratamentos, entretanto, observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) em seus valores após o teste de exaustão.

A MP declinou em 48h de refrigeração independente do meio utilizado. Em dois momentos houve diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos. No **M2** (teste de exaustão 120 minutos) a média do GGpL (39,7%) foi igual ao GEL (28,9%) e superior ao controle GGL (21,5%). De forma semelhante, no **M3**, após 48 horas de refrigeração, a média do GEL (49,2%) foi igual ao GGpL (41%) porém superior ao controle GGL (31,2%).

Trabalhando com sêmen ovino refrigerado à 15°C, Gil et al. (5), compararam o meio comercial (Bioexcell[®] - IMV, L'Aigle, França) com meios diluidores glicerolizados e a base de leite contendo diferentes concentrações de gema de ovo e constataram não haver efeito do aumento na concentração de gema de ovo acima de 10%, sobre as motilidades total/progressiva. No presente estudo foi utilizado gema de ovo na concentração de 20% para o grupo GGL e GGpL.

Moussa et al. (2) fizeram dois experimentos com sêmen bovino comparando meios comerciais, Triladyl[®] (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) a base de gema de ovo e Biociphos[®] (IMV, L'Aigle, França), a meios com diferentes concentrações do extrato de LBD (2,5, 5, 10, 15 e 20%). Estes autores obtiveram resultados superiores de motilidade com Biociphos[®] e no meio com 10% de LBD, em comparação ao Triladyl[®]. No segundo experimento compararam diluidores com concentrações entre 5 e 10% de LBD com os meios comerciais e concluíram que 8% é a concentração ideal. A concentração de LBD (8%) no diluente GGL, do presente estudo, foi definida segundo Moussa et al. (2).

Tabela 1. Médias \pm desvio padrão dos parâmetros de cinética espermática (motilidades) avaliados no sistema computadorizado do sêmen ovino pré-refrigeração (M0), pós-refrigeração 24 (M1) e 48 (M3) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) minutos e 48 horas 120 (M4) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL.

Meios	Refrigeração (h)				
	M0	24		48	
		M1	M2	M3	M4
	Motilidade total - %				
GGL	91,8 \pm 4,2 ^a	87,4 \pm 14,4 ^a	49,0 \pm 25,1 ^b	71,7 \pm 27,7 ^{ab}	23,5 \pm 18,7 ^c
GGpL	90,4 \pm 6,0 ^a	90,5 \pm 6,9 ^a	66,8 \pm 23,1 ^{bc}	74,3 \pm 20,0 ^{ab}	28,8 \pm 23,0 ^c
GEL	90,5 \pm 5,4 ^a	90,6 \pm 4,6 ^a	49,6 \pm 37,5 ^b	83,4 \pm 18,8 ^a	39,7 \pm 37,1 ^b
	Motilidade progressiva - %				
GGL	62,1 \pm 8,0 ^a	51,1 \pm 14,4 ^a	21,5 \pm 16,8 ^{bcB}	31,2 \pm 17,3 ^{bB}	6,1 \pm 6,3 ^c
GGpL	64,6 \pm 5,2 ^a	61,8 \pm 10,2 ^a	39,7 \pm 19,8 ^{bA}	41,0 \pm 17,7 ^{bAB}	11,3 \pm 14,3 ^c
GEL	66,4 \pm 4,6 ^a	56,9 \pm 14,2 ^{ab}	28,9 \pm 23,9 ^{cAB}	49,2 \pm 18,9 ^{bA}	21,0 \pm 22,7 ^c

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Para o mesmo parâmetro, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

GGL - Meio Glicina Gema Leite; **GGpL** - Meio Glicina Gema purificada Leite; **GEL** - Meio Glicina Extrato Leite.

Corcine et al. (16) em estudo com sêmen canino refrigerado a 5°C utilizando como base o meio Tris-Glucose (TG) com diferentes concentrações de LBD (6, 8 e 10%) comparado ao controle com 20% de gema de ovo, obtiveram motilidade superior ($P < 0,01$) em todos os momentos da refrigeração (24, 48, 72 e 96 horas) nos meios com LBD em comparação ao controle.

A MT não foi influenciada pelo tempo de refrigeração independente do meio utilizado ($P > 0,05$), porém declinou ($P < 0,05$) após a refrigeração/exaustão (M2 e M4). Sousa (17), avaliando o desempenho do sêmen ovino em sistema de refrigeração e transporte (Equitainer® - Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA, USA) utilizando o meio GGL com 20 % de gema de ovo, obteve declínio da MT e MP após teste de exaustão condizente com os resultados obtidos neste experimento. Para Maxwell e Salamon (18), o declínio da motilidade e da integridade morfológica dos espermatozoides são as mudanças mais observadas na refrigeração do sêmen ao longo do tempo.

Os parâmetros de retenção acrossomal (RA) e percentual de cauda espermática dobrada (CED) são apresentados na Tabela 2. O processo de refrigeração e incubação pós-refrigeração não depreciou substancialmente a qualidade da morfologia espermática, sendo que em nenhum dos momentos as médias da IA foram inferiores a 93,8% e as da CED superiores a 5,4%. Segundo Maxwell e Salamon (18) e Salamon e Maxwell (19), a gema de ovo atua prevenindo mudanças degenerativas do acrossomo.

A gema de ovo é um componente comum na composição dos meios diluidores, protegendo as células espermáticas contra o choque térmico e osmótico no processo de criopreservação (18-21). Atua na superfície da membrana espermática, restaurando a perda de fosfolipídios, prevenindo a ruptura da membrana plasmática (22). Os fosfolipídios que compõe a fração das LBD conferem proteção aos espermatozoides durante o processo de refrigeração (2, 23).

Os meios GGpL e GEL preservaram inalterada a RA durante a refrigeração por 24 ou 48 horas. Houve declínio da RA após a exaustão (M2 e M4, $P < 0,05$), porém o meio GGpL apresentou melhor desempenho no M4 ($P < 0,05$). Não houve efeito do meio sobre a ocorrência de CED, nos diferentes tempos de avaliações, entretanto o GGpL preveniu o aumento do dobramento de cauda espermática em todos os momentos estudados (Tab.2).

Tabela 2. Médias \pm desvio padrão dos parâmetros de integridade total da membrana espermática e morfologia espermática do sêmen ovino pré-refrigeração (M0), pós-refrigeração 24 (M1) e 48 (M3) horas, teste de exaustão 24 horas 120 (M2) minutos e 48 horas 120 (M4) minutos nos grupos GGL, GGpL e GEL.

Meios	Refrigeração (h)				
	M0	24		48	
		M1	M2	M3	M4
	Retenção acrossomal - %				
GGL	99,8 \pm 0,4 ^a	99,0 \pm 0,8 ^{ab}	95,5 \pm 0,9 ^b	98,1 \pm 1,5 ^b	93,8 \pm 1,3 ^{CB}
GGpL	99,8 \pm 0,4 ^a	99,6 \pm 0,7 ^a	95,8 \pm 0,9 ^b	99,4 \pm 0,6 ^a	95,4 \pm 1,0 ^{bA}
GEL	99,9 \pm 0,3 ^a	99,7 \pm 0,5 ^a	94,7 \pm 1,0 ^b	99,4 \pm 1,0 ^a	93,9 \pm 1,1 ^{bB}
	Cauda espermática dobrada - %				
GGL	5,2 \pm 1,8 ^a	4,6 \pm 1,4 ^{ab}	3,3 \pm 1,3 ^b	5,4 \pm 1,7 ^a	3,5 \pm 1,2 ^b
GGpL	4,1 \pm 1,2 ^a	4,5 \pm 1,6 ^a	3,1 \pm 1,2 ^a	4,1 \pm 1,5 ^a	3,4 \pm 0,9 ^a
GEL	5,0 \pm 1,7 ^a	4,7 \pm 1,7 ^{abc}	3,4 \pm 1,3 ^{bc}	5,0 \pm 1,1 ^a	3,2 \pm 0,9 ^c

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Para o mesmo parâmetro, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.
GGL - Meio Glicina Gema Leite; **GGpL** - Meio Glicina Gema purificada Leite; **GEL** - Meio Glicina Extrato Leite.

Sousa (17) obteve melhores resultados ($P < 0,05$) para RA no meio GGL, comparado ao meio GL (Glicose Leite) em sêmen ovino após 24 horas de refrigeração e atribuiu esses resultados a presença da gema de ovo.

As LBD têm sido utilizadas em meios para congelação nas diversas espécies. Moustacas et al. (24), em sêmen ovino congelado, observaram um maior número de lesões de acrossomo, utilizando meios com LBD liofilizada em comparação aos meios com LBD não-liofilizada. Bencharif et al. (25) e Ahmad et al. (26) obtiveram maior percentual de proteção do acrossomo com 6% de LBD no meio para espermatozoides de caninos e caprinos respectivamente.

Hu et al. (27) obtiveram maiores percentuais ($P < 0,05$) de RA, no meio contendo 8% de LBD frente aos meios com maiores e menores concentrações de LBD, no sêmen bovino criopreservado. No presente estudo, o alto percentual de acrossomos íntegros pode ser atribuído ao fato dos espermatozoides terem sido apenas refrigerados por 24 ou 48 horas.

Deve-se salientar que o sistema de refrigeração empregado utilizando o dispositivo de incubação, permite o estabelecimento de um declínio de temperatura entre 0,2-0,5°C/minuto e leva de 40 a 100 minutos para atingir 17°C, mantendo ritmo de declínio até atingir 5°C (7). Esse ritmo é considerado ideal para a preservação das características espermáticas de motilidade e morfologia, durante o processo de refrigeração.

CONCLUSÃO

A gema de ovo “purificada” e o extrato de lipoproteínas de baixa densidade podem substituir a gema de ovo *in natura* no meio diluente Glicina Gema Leite, para a refrigeração do sêmen ovino por até 48 horas, sem prejuízos aos parâmetros espermáticos de motilidade e morfologia.

Projeto de pesquisa aprovado no CEEA número: 200/2008 em 21/10/2008.

REFERÊNCIAS

1. Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, et al. Bull semen in vitro fertility after criopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl[®], a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 2004;61:895-907.
2. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen Egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 2002;57:1695-706.
3. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev*. 2006;73:1338-44.
4. Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guienne B, Guérin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 1998;50:699-706.
5. Gil J, Rodriguez-Irazaqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell[®] and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*. 2003;59:1157-70.
6. Gonzalez CIM, Oba E, Bicudo SD, Souza MIL. Cryopreservation of semen in Ideal rams with glycine-egg yolk-extender. In: *Proceedings of the 13^o International Congress of Animal Reproduction*; 1996, Sydney. Sidney: ICAR; 1996. p.2-9.
7. Davis RO, Rothmann SA, Overstreet MD. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertil Steril*. 1992;57:648-53.
8. Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*. 1973;25:382-91.
9. Bicudo SD, Paschoal JPS, Ribeiro EFR, Papa FO. Dispositivo de incubação para o resfriamento de sêmen em pequenos volumes. *Rev Bras Reprod Anim*. 1991;2:456.
10. Paganini Filho P. Estudo da viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes em temperatura de 37°C e sob-refrigeração [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 1999.
11. Fisher LD, Belle GV. *Biostatistics a methodology for the health sciences*. New York: Wiley-Interscience; 1993.
12. Henry M, Neves JP. *Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; 1996.
13. Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantis I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Rumin Res*. 2000;37:125-30.
14. Boundy T. Collection and interpretation of ram semen under general practice conditions. *In Pract*. 1993;15:219-23.

15. Sousa DB, Bicudo SD, Papa FO, Ferreira JCP. Comparative study of two methods of collect the ram semen (artificial vagina and eletroejaculation) being used conventional and computerized analyses (HTMA-IVOS 10). In: Proceedings of the 26° World Veterinary Congress; 1999. Lyon. Lyon: WVA; 1999.
16. Corcine CD, Varela Jr AS, Ulguin RR, Bianchi I, Alvarenga MVF, Lucia Jr T, et al. Efeito da lipoproteína de baixa densidade da gema de ovo sobre a qualidade do sêmen canino resfriado a 5°C [Internet]. In: Anais do 13° Congresso de Iniciação Científica; 2004, Pelotas. Pelotas-RS: Universidade Federal de Pelotas; 2004 [acesso em 2008 Ago 29]. Disponível em: http://www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CA_01100.rtf
17. Sousa DB. Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2002.
18. Maxwell WMC, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fertil Dev.* 1993;5:613-38.
19. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;62:77-111.
20. Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 1996;42:55-65.
21. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 2009;10:49-62.
22. Farstard W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci.* 1996;42:251-60.
23. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology.* 2002;57:327-44.
24. Moustacas VS, Zaffalon MA, Lagares MA, Loaiza-Eccheverri AM, Varago FC, Neves MM, et al. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology.* 2011;75:300-7.
25. Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, et al. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology.* 2008;70:1478-88.
26. Ahmad MZAA, Chatagnon G, Amirat-Briand L, Moussa M, Tainturier D, Anton M, et al. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reprod Domest Anim.* 2008;43:429-36.
27. Hu JH, Jiang ZL, Lv RK, Li QW, Zhang SS, Zan LS, et al. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology.* 2011;62:83-7.

Recebido em: 11/07/11

Aceito em: 17/10/12

CONDENAÇÕES POR ASPECTO REPUGNANTE EM FRANGOS ABATIDOS SOB INSPEÇÃO ESTADUAL, NO MUNICÍPIO DE SÃO GONÇALO DOS CAMPOS – BAHIA, BRASIL.

Victor Toshio Ito Shiraishi¹
Pedro Alexandre Gomes Leite²
Karoline Ribeiro Nascimento³

RESUMO

O Brasil é o terceiro maior produtor e exportador de carne de frango do mundo. Os estados que concentram o maior volume de abate são: Paraná (26,5%), Santa Catarina (18,8%) e Rio Grande do Sul (15,3%). O estado da Bahia encerrou o ano de 2009 em 10º lugar no ranking nacional, tendo abatido 64.598.271 milhões de cabeças. O controle da sanidade desses produtos avícolas é realizado pelos serviços de inspeção oficiais, que se baseiam em legislação específica, como o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), assim como pela Portaria nº. 210 de 10 de novembro de 1998, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O número de condenações totais de frangos ocorre principalmente pela carcaça apresentar-se com aspecto repugnante, caracterizando-se por odor, cor e/ou aspecto anormais. Neste estudo o objetivo foi quantificar o número de condenações por aspecto repugnante no período de um ano, em um matadouro frigorífico sob inspeção estadual localizado no município de São Gonçalo dos Campos – BA. No período foram abatidos 16.669.458 aves, para o qual o número de aves com aspecto repugnante totalizou 52.263, representando frequência de 0,31% em relação ao total de frangos abatidos. O aspecto repugnante foi considerado com terceira maior causa de condenações totais. As maiores condenações ocorreram nos meses de abril e maio, período no qual a temperatura ambiente foi mais baixa. É possível associar-se este fato à ocorrência de casos de aerossaculite, comum nessa época do ano, e que é responsável por um quadro de problemas respiratórios que leva ao estresse das aves.

Palavras-chave: aves, carne, inspeção.

CONDEMNATIONS FOR VILE ASPECT IN SLAUGHTERED CHICKENS ANSWERABLE TO STATE INSPECTION LOCATED IN THE TOWNSHIP OF SÃO GONÇALO DOS CAMPOS – BA

ABSTRACT

Brazil has become the world's third largest exporter and producer of poultry meat. The states with the highest volume of slaughter are: Paraná (26,5%), Santa Catarina (18,8%) and Rio Grande do Sul (15,3%). The state of Bahia, at the end of 2009, hit the 10th position on national ranking with 64.598.271 million heads slaughtered. The inspection of these poultry products follows the precepts of an official inspection service, which are based on specific legislations such as the Regulation of Industrial and Sanitary Inspection of Products of Animal Origin - RIISPOA, as well as the Ordinance nº 210 dated 10 November 1998 from Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. The total number of poultry condemnation is,

¹ Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz, - UESC, Rua Eleozibio Cunha, 646, Bairro: Bela Vista. CEP 45997-003, Teixeira de Freitas-BA. (73)8834-9779 ou 9133-4282. victortoshio@hotmail.com.

² Professor Assistente do curso de Medicina Veterinária – Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais – UESC, Rod. Ilhéus/Itabuna, Km 16. CEP 45662-900, Ilhéus-BA. (73) 3680-5344 ou 3680-5140. pagleite@hotmail.com.

³ Médica Veterinária, coordenadora do controle de qualidade da Gujão Alimentos LTDA – BA 502. Km 27,8. CEP 44330-000, São Gonçalo-BA. (71) 9166-9540. karoline.nascimento@hotmail.com

mainly, consequence of carcasses with vile aspects, like smell, color and/or abnormal aspect. The goal of this study was quantifying the number of condemnations for vile aspects in a year, in a slaughterhouse freezer answerable to state inspection located in the township of São Gonçalo dos Campos - BA. During this period, 16.669.458 chickens were slaughtered, from these, 52.263 chickens have had vile aspect, representing a frequency of 0,31% toward the slaughtered poultry total. The vile aspect was considered the third greatest cause of total condemnation. The greatest condemnations occurred in April and May when the environmental temperature was lowest. It's possible to associate this fact to the occurrence of sacculitis, common in this time of year and responsible for many breathing problems that brings stress on birds.

Keywords: poultry, meat, inspection.

CONDENACIONES POR ASPECTO REPUGNANTE DE POLLOS SACRIFICADOS BAJO CONTROL DE LA INSPECCIÓN ESTATAL EN EL MUNICIPIO DE SÃO GONÇALO DOS CAMPOS-BAHIA, BRASIL.

RESUMEN

Brasil es el tercer mayor productor y exportador de carne de pollo del mundo. Los estados con el mayor volumen de sacrificio de pollos son Paraná (26,5%), Santa Catarina (18,8%) y Rio Grande do Sul (15 3%). El estado de Bahia terminó el año de 2009 en la 10ª posición en el país, con 64.598.271 millones de pollos sacrificados. El control sanitario de estos productos de aves es realizado por los servicios oficiales de inspección, basados en una legislación específica, el Reglamento de Inspección Industrial y Sanitaria de los Productos de Origen Animal (RIISPOA) y por la Ordenanza N° 210, de 10 de noviembre de 1998, del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento. El mayor número de condenaciones totales de pollos ocurre principalmente por aspecto repugnante de la canal, caracterizado por olor, color y aspecto anormales. Este estudio tuvo como objetivo cuantificar el número de condenaciones por aspecto repugnante durante el año de 2010 en un rastro bajo inspección del Estado en el municipio de São Gonçalo dos Campos – Bahia, Brasil. Durante este período, fueron sacrificadas 16.669.458 aves, de las cuales 52.263 presentaron aspecto repugnante, es decir, una frecuencia de 0.31% de las aves sacrificadas. El aspecto repugnante fue considerado la tercera mayor causa de condenaciones totales durante este período. Los índices de condenación por aspecto repugnante fueron mayores en los meses de abril y mayo, cuando las temperaturas fueron más bajas. Es posible asociar este hecho a la gran cantidad de aerosaculitis, común en esta época del año y que es responsable por una serie de problemas respiratorios que originan estrés en las aves.

Palabras clave: pollo, carne, inspección.

INTRODUÇÃO

Nos últimos 26 anos (1983 a 2009), o consumo de carne de frango (*Gallus gallus*) no Brasil cresceu 300%, enquanto que a de carne bovina recuou e a de suína aumentou de forma moderada. A explicação para este fenômeno se deu principalmente pelo fator preço, pois trata-se de uma proteína de baixo custo, com ciclo produtivo curto que permite rápido ajuste a ofertas, impedindo explosões de preços, além de possuir a imagem de um produto mais saudável (1).

No ano de 2009 o Brasil ocupou o 3º lugar no ranking mundial de produção de carne de frango (10,980 milhões ton.), perdendo apenas para os Estados Unidos (15,980 milhões ton.)

e para a China (12,100 milhões ton.), e liderou neste ano o ranking de maior exportador de frango, somando um total de 3,634 milhões de toneladas, mas que representou uma queda de 0,3% em comparação ao ano de 2008. Toda essa exportação significou 64,32% do total de exportações das carnes brasileiras (2). Segundo o IBGE (3) os estados que concentram o maior volume de abate de frangos são o Paraná (26,5%), Santa Catarina (18,8%) e Rio Grande do Sul (15,3%).

Na Bahia, só a partir de 1997 surgiram os primeiros projetos para a instalação de matadouros frigoríficos industriais na microrregião de Feira de Santana. A região do Recôncavo Baiano oferece vantagens, em comparação com as demais regiões do estado, pelo fato de se encontrar em situação privilegiada por dispor de recursos humanos e materiais, quantitativa e qualitativamente em abundância, e com condições de suprir o mercado interno e promover a exportação para outros países (4).

O controle da sanidade desses produtos é realizado pelos serviços de inspeção oficiais, que se baseiam em legislação específica, como o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) e pela Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

A inspeção é efetuada individualmente durante o abate, pelo exame visual macroscópico de carcaças, vísceras e, conforme o caso, palpação e cortes. Casos de não conformidades são conduzidos para o Departamento de Inspeção Final (DIF) onde são liberadas ou condenadas, de acordo com o julgamento do veterinário responsável (5).

As condenações são frequentes no dia a dia dos frigoríficos especializados, gerando grandes prejuízos econômicos à indústria avícola, entretanto atrelado a estes prejuízos advém a saúde dos consumidores. Diversas são as causas que podem levar a condenação total de um frango, e entre as principais está a ocasionada por carnes com aspecto repugnante (6-9).

O artigo 172 do RIISPOA afirma que “carnes repugnantes são assim consideradas e condenadas totalmente as carcaças que apresentem mau aspecto, coloração anormal ou que exalem odores medicamentosos, excrementiciais, sexuais ou outros considerados anormais”. Ainda no RIISPOA no seu artigo 236 diz que “devem ser condenadas as aves, inclusive de caça, que apresentem alterações putrefativas, exalando odor sulfídrico-amoniaco, revelando crepitação gasosa à palpação ou modificação de coloração da musculatura” (5).

Quantificar os achados de inspeção *post-mortem* e utilizá-los da forma correta geram mais benefícios do que a simples retirada das carcaças, por possibilitar medidas de ações preventivas sobre a matéria-prima, minimizando o número de condenações. Assim, neste trabalho objetivou-se quantificar e discutir as possíveis causas de condenações por aspectos repugnantes ocorridas em matadouro frigorífico sob inspeção estadual situado no município de São Gonçalo dos Campos – BA.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um levantamento dos casos de condenações por aspectos repugnantes registrados pelo Serviço de Inspeção Estadual (S.I.E.) nº 525 no matadouro Frigorífico de Aves e Coelhoos, localizado no município de São Gonçalo dos Campos – Bahia, no período de 01 de agosto de 2009 a 31 de julho de 2010.

Todas as aves eram de produtores em sistema de integração, no qual a empresa, além de fornecer toda a matéria-prima, oferece a assistência técnica e veterinária. Geralmente o abate é realizado após 40 a 45 dias de vida. A distância percorrida no transporte das aves, da granja até o frigorífico, variou de 10 a 140 km.

Por se tratar de uma alteração *post-mortem* a inspeção e possíveis condenações por aspecto repugnante são realizadas na linha C, no qual se realiza o exame externo do frango, efetuado por pessoas devidamente treinadas e qualificadas pelo S.I.E.

O fluxograma das atividades deste abatedouro seguia modelo considerado padrão para estabelecimentos que realizam a mesma atividade, estando em acordo com a legislação em vigência e apresentava as seguintes particularidades: atordoamento realizado por eletronarose e a escaldagem e o pré-resfriamento realizados por imersão em tanques (4).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período analisado, foi abatido um total de 16.669.458 aves. As condenações por aspectos repugnantes totalizaram 52.263 aves, significando uma frequência de 0,31% em relação ao total abatido. Este dado colocou as condenações por aspecto repugnante como a terceira maior causa de condenações totais no período (figura 1). Em alguns trabalhos, o aspecto repugnante é a principal causa de condenação total em frangos (6-9).

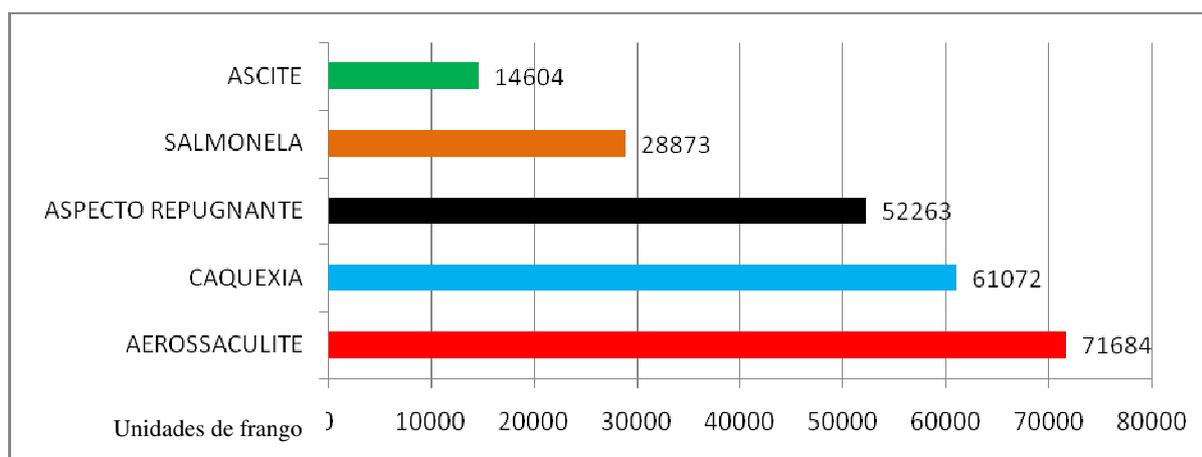


Figura 1. Principais causas de condenações totais em frigorífico estadual de São Gonçalo dos Campos - BA, no período de 01 de agosto de 2009 a 31 de julho de 2010.

De acordo com Silva (6), na região do Recôncavo Baiano, as condenações totais por aspecto repugnante atingiram 0,23%, do total de frangos abatidos. Já Giotto (8), na região Oeste de Santa Catarina, observou um índice de condenações totais por aspecto repugnante de 0,48%. Schilestein (7), mostrou que as condenações por aspecto repugnante em perus (*Meleagris gallopavo*), no estado do Rio Grande do Sul, significou 0,255% em relação ao total de aves abatidas. Macahyba et al. (9), na região Oeste de Santa Catarina, também encontrou para aspecto repugnante em perus um total de 0,29% do total abatido.

As formas mais comuns de alterações observadas em frangos condenados por aspecto repugnante são por uma alteração da cor de toda a musculatura da carcaça para uma cor vermelha escura, com aspecto dura e seca, fato conhecido como carne DFD (do inglês *Dark, Firm and Dry*), ou então a coloração de toda a musculatura da carcaça apresentando-se pálida, mole e exsudativa, conhecida como carne PSE (do inglês *Pale, Soft and Exsudative*) (10) (figura 2). Comumente encontradas em carnes suínas, as carnes DFD e PSE estão correlacionadas principalmente ao estresse crônico e agudo pré-abate, respectivamente (11).

Os fatores ligados ao estresse pré-abate dos frangos acabam sendo um problema que constantemente deve ser observado e minimizado, sendo capazes de desencadear transtornos fisiológicos que podem causar alterações bioquímicas anômalas durante a transformação do músculo em carne, afetando a estrutura miofibrilar (12).

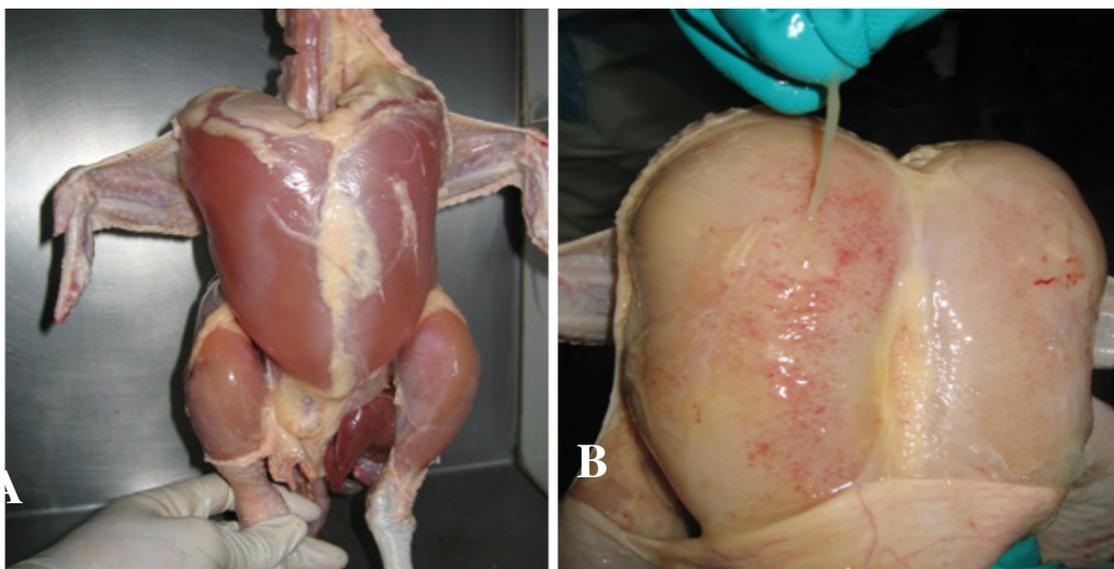


Figura 2. Imagem de frango com característica de carcaça DFD (A) e outro com característica de carcaça PSE (B). Fonte: Arquivo pessoal.

Pode-se citar alguns fatores ligados ao estresse pré-abate que influenciam direta ou indiretamente no aspecto e qualidade da carcaça, como alocação dos indivíduos por gaiolas, espaçamento de gaiolas no caminhão, ducha de água na granja, cobertura de lona quando o transporte é realizado sob o sol, aspersão de água, transporte, espera e ventilação na recepção do abatedouro.

Denadai et al. (13), analisaram o efeito da duração do jejum pré-abate sobre o rendimento de carcaça e qualidade da carne do peito de frangos de corte, com três períodos de jejum 0, 4 e 8 horas e concluíram que os períodos de jejum estudados não foram suficientes para causar alterações na qualidade da carne. Também, Castro (14), analisando diferentes períodos de jejum (3, 6, 10, 12, 15 e 18 horas) não encontrou alterações na qualidade da carne, mas observou que o aumento do período de jejum alimentar tornou a carne de peito mais escura, apesar de não apresentar diferença significativa. Entretanto, o rendimento de carcaça é afetado, pois à medida que o período de jejum aumentava, mais peso a ave perdia. Verkamp apud Langer (15), citou que o jejum de até 6 horas pré-abate pode melhorar o impacto do estresse térmico por reduzir o calor produzido pelo metabolismo do alimento ingerido.

Uma das principais causas de estresse nos frangos de corte está relacionada principalmente ao seu desconforto térmico. Assim, a análise dos dados mensais deve ser feita principalmente para a observação de possível interferência do clima no conforto dos frangos.

De acordo com os dados analisados (Figura 3), observou-se um aumento no número de condenações totais por aspecto repugnante nos meses de abril e maio, o que diverge dos dados de Macahyba et al. (9) e Silva (6), que mostraram que tais condenações ocorreram em maior número nos meses de temperaturas mais elevadas.

O correto manejo do controle da temperatura ambiental nos galpões deve ser realizado em qualquer época do ano. Nos meses com baixa umidade relativa do ar (UR) não houve um aumento do número de condenações, entretanto nos meses com uma maior UR, os números se apresentaram com aumentos consideráveis. Silva et al. (16) mostraram que a partir de 30 minutos de exposição às condições de alta temperatura e UR (35° C e 85%) as aves já apresentaram evidências de estresse térmico em sua carcaça.

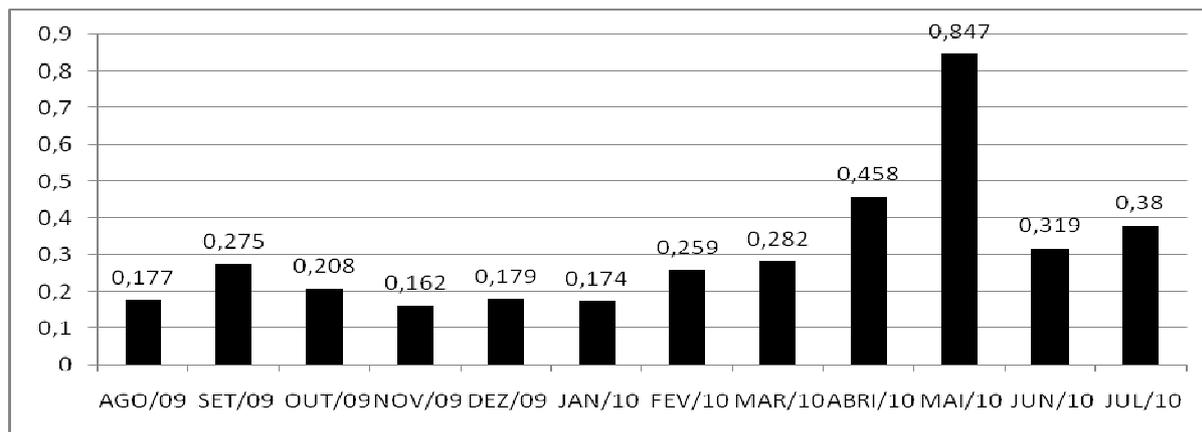


Figura 3. Percentagem de condenações mensais por aspecto repugnante em relação ao total de frangos abatidos, durante o período de 01 de agosto de 2009 a 31 de julho de 2010.

O grande problema que a elevada UR traz para as aves é o aparecimento de patologias respiratórias. Kristensen e Wathes apud Silva (6) citou que o elevado teor de UR facilita a absorção da amônia pelas partículas de poeira, e este elevado teor de umidade na cama e liberação de amônia propicia o desenvolvimento de patógenos que, por sua vez, são inalados, levando ao aparecimento das aerossaculites (Figura 4). O desenvolvimento da aerossaculite nas aves acarreta maior dificuldade de respiração, tornando menos eficientes as trocas gasosas e de calor. Com a sua função fisiológica comprometida, é possível que esta patologia deixe os frangos mais susceptíveis ao desenvolvimento das carcaças com aspecto repugnante pelo estresse ocorrido em longo prazo.

Vieira et al. (17), afirmaram que perdas econômicas na cadeia produtiva de frangos de corte ocorrem principalmente nas atividades “pós-porteira”, de nada adiantará a preocupação do produtor com as sete semanas de produção se a perda ocorre ao longo do carregamento, transporte e espera junto ao abatedouro.

O efeito do banho com água na granja, após o carregamento dos frangos, é uma técnica para reduzir o calor no lote, nas horas mais quentes do dia e UR abaixo de 60%. Langer (15), mostrou que em temperaturas de 26 a 29°C e em distâncias curtas (inferior a 68 km) o molhamento das caixas antes do transporte mostra um efeito prejudicial, aumentando o índice de carnes PSE, entretanto em distâncias mais longas o seu efeito se torna benéfico.

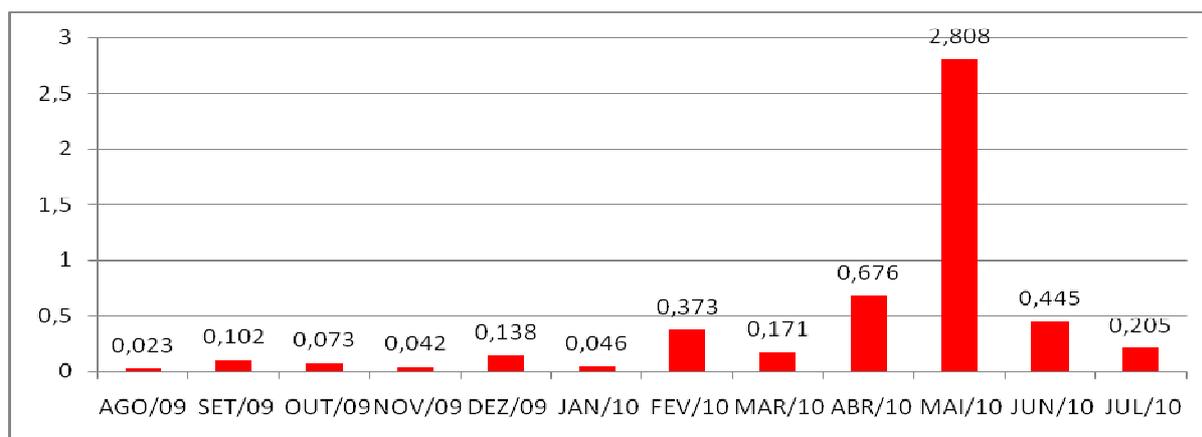


Figura 4. Condenações mensais por aerossaculite (%) em relação ao total de frangos abatidos, durante o período de 01 de agosto de 2009 a 31 de julho de 2010.

CONCLUSÃO

O número de condenações por aspecto repugnante é relativamente elevado, e quantificar estes resultados significa calcular o total de prejuízos a indústria avícola a fim de tentar corrigir ou até mesmo minimizar este problema. O presente estudo mostrou que as condenações por aspecto repugnante se mantêm na média das demais pesquisas realizadas em diferentes regiões.

Sugere-se um investimento maior em treinamentos para os responsáveis pelo manejo de apanha e carregamento na granja, assim como dos funcionários da recepção dos matadouros frigoríficos de modo a diminuir ao máximo o estresse e conseqüentemente as condenações por aspecto repugnante.

REFERÊNCIAS

1. Ferraz JB. Consumo de carne de frango no país sobe 300% em 26 anos [Internet]. Federação da Agricultura e Pecuária de Goiás; 2010 [acesso em 2010 Nov 28]. Disponível em: http://www.faeg.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=6495:consumo-de-carne-de-frango-no-pais-sobe-300-em-26-anos&catid=14:ultimas-noticias&Itemid=16.
2. União Brasileira de Avicultura - UBABEF. Relatório Anual Abef 2009/2010 [Internet]. São Paulo; 2010 [acesso em 2010 Set 01] Disponível em: http://www.abef.com.br/noticias_portal/exibenoticia.php?notcodigo=2264.
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Animal no 1º Trimestre de 2009 [Internet]. Rio de Janeiro; 2009 [acesso em 2010 Set 01]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/a-bate-leite-couro-ovos_200901comentarios.pdf
4. Carmo RBA. Perspectiva para avicultura de corte na Bahia [Internet]. Bahia Agric. 1999;3:3 [acesso 2010 Set 01]. Disponível em: http://www.seagri.ba.gov.br/revista/rev_1199/avi_cort.htm.
5. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carnes de Aves. Portaria nº. 210, de 10 de novembro de 1998. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 1998 Nov 26. Seção 1, p.226.
6. Silva VDA. Inspeção de aves: estudo das principais causas de condenação total de exame post-mortem, em matadouro de aves do estado da Bahia, sob inspeção federal [monografia]. Salvador: Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia; 2005.
7. Schilestein A. Avaliação das causas de condenações em perus (*Meleagris gallopavo*) em 2005 e 2006 no estado do Rio Grande do Sul [dissertação]. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria; 2007.
8. Giotto DB. Análise temporal e espacial de condenações de frangos em um matadouro-frigorífico [dissertação]. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria; 2008.

9. Macahyba RB, Mano SB, Freitas MQ, Baptista RF. Condenação post-mortem em perus (*Meleagris gallopavo*) criados na região oeste catarinense e abatidos sob inspeção federal. *Rev Bras Cienc Vet.* 2005;12:53-7.
10. Venturini KS, Sarcinelli MF, Silva LC. Característica da carne de frango [boletim técnico]. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo; 2007.
11. Wariss PD, Brown SN. Bem estar suíno e qualidade da carne: uma visão britânica. In: *Anais da 1ª Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína*; 2000, Concórdia. Concórdia/SC: Embrapa Suínos e Aves; 2000. p.17-20.
12. Praxedes CIS. Exsudação de gel no cozimento em carnes de peito de frango normal, “PSE” e “DFD” [dissertação]. Niterói: Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense; 2007.
13. Denadai JC, Mendes AA, Gargia RG, Almeida ICL, Moreira J, Takita TS, et al. Efeito da duração do período de jejum pré-abate sobre rendimento de carcaça e a qualidade da carne de peito de frango de corte. *Rev Bras Cienc Avic.* 2002;4:101-9.
14. Castro JBJ. Efeito do jejum alimentar na qualidade da carne de frango de corte criados em sistema convencional [dissertação]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo; 2006.
15. Langer ROS. Efeito do transporte na incidência de PSE (palet, soft and exudative) e análogos ao DFD (dark, firm and dry) em filés de frango [dissertação]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2007.
16. Silva MAN, Barbosa Filho JAD, Silva CJM, Rosario MF, Silva IJO, Coelho AAD, et al. Avaliação do estresse térmico em condições simuladas de transporte de frangos de corte. *Rev Bras Zootec.* 2007;36:1126-30.
17. Vieira FMC, Silva IJO, Santos RFS, Barbosa Filho JAD. Redução de perdas nas operações pré-abate de frangos de corte [anúário 2010]. *Avic Ind.* 2009;1184(11):90-6.

Recebido em: 17/12/10

Aceito em: 19/10/12

ANALGESIA PERIDURAL COM ROPIVACAÍNA ASSOCIADA AO MIDAZOLAM EM CADELAS SUBMETIDAS À OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA¹.

Jiancarlo Tortoza Bignelli e Canôa²
Verônica Batista de Albuquerque³
Guillermo Carlos Veiga de Oliveira⁴
Joana Zafalon Ferreira⁵
Juliana Pelloi Vides⁶
Alexandre Alves Silveira Souza⁷
Paulo Sergio Patto dos Santos⁸
Renata Navarro Cassu⁹
Valéria Nobre Leal de Souza Oliva¹⁰

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos paramétricos, analgésico, sedativo e a dose mais adequada de midazolam (50 ou 100µg/kg) associado à ropivacaína pela via peridural em cadelas submetidas à OSH eletiva. Participaram do estudo 24 cadelas sadias, adultas, de diferentes raças, com peso médio de 8,25±2,26 kg, as quais foram pré-medicadas com acepromazina (0,05mg/kg, IM), seguindo-se a indução e a manutenção anestésica com propofol (5 mg/kg) e isoflurano, respectivamente, sendo alocadas em três grupos experimentais: GR - ropivacaína 0,2 mL/kg, GM100 - midazolam (100µg/kg) + ropivacaína 0,2mL/kg e GM50 - midazolam (50µg/kg) + ropivacaína 0,2mL/kg. Foram avaliados: frequências cardíaca e respiratória, pressão arterial sistólica, temperatura retal, saturação de oxigênio na hemoglobina, variáveis hemogasométricas, concentração plasmática de cortisol, grau de analgesia pós-operatória e sedação. Os dados foram submetidos à ANOVA, seguidas pelo teste *Tukey* no programa SAS (p<0,05). Para as variáveis qualitativas ordinais foram realizados os testes *Kruskal-Wallis*, teste de *Friedman* e o teste de *Dunn*. Foram observados efeitos analgésicos mais duradouros do anestésico local no grupo dos animais em que se utilizou a dose de 100µg/kg de midazolam, quando comparado aos grupos GM50 e GR. Adicionalmente, 50% dos animais do grupo GM100 receberam analgesia resgate 12 horas após a cirurgia. A associação do midazolam na dose de 100µg/kg à ropivacaína apresentou efeito superior à dose de 50µg/kg de midazolam, que não potencializou o efeito analgésico, porém, prolongou o período de analgesia residual no pós-operatório. Concluiu-se que a associação do midazolam à ropivacaína não produziu alterações paramétricas significativas, nem efeitos adicionais sobre a sedação, entretanto o midazolam na dose de 100µg/kg pode ser mais uma opção no tratamento pós-operatório anti-álgico em cadelas submetidas à OSH.

Palavras-chave: Cão, benzodiazepínico, OSH, analgesia epidural, anestésico local.

¹ FAPESP – Auxílio Pesquisa – Processo n°. 2008/511444-4

² Professor colaborador da Fundação Educacional de Andradina – FEA – Andradina – tortoza@gmail.com

³ Professora da Faculdade Integrado de Campo Mourão – Campo Mourão - vevebat@yahoo.com.br

⁴ Professor da Universidade Metropolitana de Santos – UNIMES - Santos – guillermo_veiga@hotmail.com

⁵ Aluna do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - Doutorado - UNESP – Araçatuba - jzafalon@hotmail.com

⁶ Aluna do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal-Doutorado - UNESP - Araçatuba- juzinhapelloi@hotmail.com

⁷ Médico Veterinário Autônomo – alexalvesouza@hotmail.com

⁸ Professor Assistente Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - Unesp – Araçatuba- patto@fmva.unesp.br

⁹ Professora Departamento de Anestesiologia Veterinária-UNOESTE-Rodovia Raposo Tavares km 572 - renavarro@uol.com.br

¹⁰ Professora Adjunto Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - Unesp – Araçatuba — Rua Clóvis Pestana – 793 - Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP - Brasil. CEP 16050-680, (18) 36361432, e-mail – voliva@fmva.unesp.br- Autor para correspondência.

EPIDURAL ANALGESIA WITH ROPIVACAINE ASSOCIATED TO MIDAZOLAM IN OVARIOSALPINGOHISTERCTOMY BITCHES

ABSTRACT

This research aimed evaluate the parametric, analgesic, sedative effects and most appropriate dose of midazolam (50 or 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) for epidural anesthesia in bitches submitted an elective ovariosalpingohisterectomy. Twenty-four bitches tool part study, adults, different breeds, mediun weigh 8.25 ± 2.26 kg and premedicated with acepromazine (0.05 mg.kg^{-1} , IM), followed by anesthetic induction and maintenance with propofol (5 mg.kg^{-1}) and isoflurane, respectively, and allocated in three experimental groups: GR - ropivacaine 0.2 mL.kg^{-1} , GM50 - midazolam (50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) + ropivacaine 0.2 mL.kg^{-1} and GM100 - midazolam (100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) + ropivacaine 0.2 m.Lkg^{-1} . The heart and respiratory rate, indirect systolic arterial pressure, rectal temperature, oxygen saturation in hemoglobin, blood gas variables, plasma cortisol, degree of postoperative analgesia and sedation were evaluated. The results was submitted to ANOVA followed by Tukey test in the SAS ($p < 0.05$). From the qualitative variables were performed ordinal tests Kruskal-Wallis, Friedman and Dunn tests. Were observed effects more durable local anesthetic in the group of animals that used the 100 $\mu\text{g/kg}$ dose of midazolam as compared to the groups GM50 e GR. Additionally, 50% of the animals tested GM100 received rescue analgesia 12 hours after surgery. The combination of midazolam in the dose of ropivacaine had 100 $\mu\text{g/kg}$ the upper end of the dose of midazolam 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, not increasing the analgesic effect, however, extending the period of residual postoperative analgesia. It was concluded that the association of midazolam to ropivacaine did not produce significant parametric changes or additional sedation effects, but midazolam in 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ may be another option in releave post-operative pain in bitches subjected the OSH.

Keywords: dogs, benzodiazepine, OSH, epidural analgesia, local anesthetic.

ANALGESIA EPIDURAL CON ROPIVACAÍNA ASOCIADA A MIDAZOLAN EN PERRAS SOMETIDAS A OVARIOSALPINGOHISTERECTOMÍA

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos paramétricos, analgésico, sedativo y la dosis más adecuada de midazolam (50 o 100 ug/Kg) por vía epidural en perras sometidas a ovariosalpingohisterectomía (OSH) electiva. En el estudio fueron incluidas 24 perras sanas, adultas, de distintas razas, con un promedio de peso de $8,25 \pm 2,26$ Kg, las cuales fueron premedicadas con acepromazina (0,05 mg/Kg , IV), seguida por la inducción y la anestesia con propofol (5 mg/Kg) e isoflurano, respectivamente. Los animales fueron colocados en tres grupos experimentales: GR – ropivacaína (0,2 ml/Kg); GM 50 – midazolam (50 ug/Kg) + ropivacaína (0,2 ml/Kg) e GM 100 – midazolam (100 ug/Kg) + ropivacaína (0,2 ml/Kg). Fueron evaluados: frecuencia cardíaca y respiratoria, presión arterial sistólica, temperatura rectal, saturación de oxígeno en la hemoglobina, variables hemogasométricas, concentración plasmática de cortisol, grado de analgesia postquirúrgica y sedación. Los datos fueron sometidos a ANOVA, seguidas por el test Tukey en el programa SAS ($p < 0.05$). Las variables cualitativas ordinales fueron evaluadas con las pruebas de Kruskal-Wallis, prueba de Friedman y la prueba de Dunn. Fueron observados efectos más duraderos del anestésico local en el grupo de animales que utilizaron dosis 100 ug/Kg de midazolam, cuando se comparó a los grupos GM 50 y GR. Además, 50% de los animales del grupo GM 100 recibieron analgesia 12 horas después de la cirugía. La asociación de midazolam (100 ug/Kg) y ropivacaína presentó un mejor efecto que la dosis de 50 ug/Kg , que si bien no potencializó el

efecto analgésico, prolongó el período de analgesia residual postquirúrgica. Se concluye que la asociación del midazolam y de la ropivacaína no produjo alteraciones paramétricas significativas ni efectos adicionales en la sedación. Sin embargo, el midazolam a 100ug/Kg puede ser una opción adicional en el tratamiento postoperatorio antiálgico en perras sometidas a OSH.

Palabras clave: perros, benzodiazepina, OSH, analgesia epidural, anestésico local.

INTRODUÇÃO

Atualmente a preocupação com o bem estar animal vem ganhando destaque na medicina veterinária fazendo com que o profissional possua maior compromisso com o alívio da dor e do sofrimento animal. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a mesma é definida como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável que está associada a lesões reais ou potenciais” (1).

O grau de dor previsto para uma ovariosalpingohisterectomia (OSH) segundo Tranquilli, Grimm e Lamont (2) é de moderado a intenso, sendo necessária a administração de analgésicos, podendo ser feito até mesmo no momento pré-operatório (analgesia preemptiva).

Uma das alternativas no controle da dor é a aplicação de fármacos pela via peridural tendo a finalidade de anestésiar e/ou promover analgesia. A anestesia peridural é comumente realizada com anestésicos locais podendo-se associá-los, com o objetivo de promover analgesia trans e pós-operatória, a outras classes farmacológicas como os anestésicos dissociativos, agonistas alfa-2 ou opioides (3-5).

Os benzodiazepínicos também constituem uma alternativa na associação aos anestésicos locais no homem, trazendo alguns incrementos na anestesia peridural. A administração destes fármacos pela via peridural na espécie humana foi realizada acidentalmente com o uso do diazepam, promovendo sedação reversível e paralisia motora e sensitiva (6). A associação de midazolam (um benzodiazepínico hidrossolúvel) a um anestésico local também foi amplamente estudada no homem, sendo descrito incremento analgésico além de promover sedação e amnésia (7-9).

Contudo, em medicina veterinária, a utilização clínica de benzodiazepínicos pela via peridural não é realizada e poucos estudos relatam tais experiências na espécie canina. Sendo assim, objetivou-se avaliar os efeitos paramétricos, analgésico, sedativo e a dose mais adequada de midazolam associado à ropivacaína pela via peridural em cadelas submetidas à OSH eletiva.

MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi realizado nas dependências do laboratório de cirurgia e anestesiologia experimental da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), UNESP - campus de Araçatuba. Foram utilizadas 24 cadelas sadias, adultas, de diferentes raças, com peso médio de $8,25 \pm 2,26$ kg, previamente selecionadas para a realização da OSH eletiva. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética na experimentação animal (CEEA) local (protocolo número 2007-009207).

Os animais foram submetidos a exame físico geral, colheita de sangue para realização de hemograma e sorologia para leishmaniose visceral canina, por tratar-se de uma região endêmica para esta doença. A partir dos resultados dos exames, somente aquelas cadelas que não apresentaram alterações foram incluídas no estudo.

As cadelas foram trazidas 12 horas antes da cirurgia e a tricotomia foi realizada na presença do proprietário para a minimização do estresse. Na sequência, os animais foram alojados em gaiolas individuais e pernотaram no canil do laboratório de cirurgia e

anestesiologia experimental, de modo que o jejum hídrico (4 horas) e sólido (12 horas) fosse cumprido. No dia da cirurgia, receberam como medicação pré-anestésica acepromazina¹¹ (0,05 mg/kg IM) e, decorridos 15 minutos, foi realizado o acesso venoso (veia cefálica) para infusão do fluido de manutenção (ringer com lactato¹²) na taxa de 10 mL/kg/h, mantida por meio de bomba de infusão peristáltica¹³ e para a realização da indução anestésica com propofol¹⁴ (5,0 mg/kg IV). Procedia-se então, a intubação com sonda orotraqueal de diâmetro adequado seguida pela manutenção anestésica com isofluorano¹⁵ em concentração inicial de 1,5% em fluxo de oxigênio a 100%. Os animais foram colocados sobre um colchão térmico¹⁶ na calha cirúrgica, para minimizar a perda da temperatura corpórea e as cirurgias foram realizadas sempre pela mesma equipe cirúrgica, padronizando-se a técnica e o tempo máximo cirúrgico de 60 minutos.

Após início da anestesia inalatória as cadelas foram posicionadas em decúbito esternal, com os membros pélvicos flexionados em direção cranial e a anestesia peridural foi realizada introduzindo-se uma agulha hipodérmica (30x8mm) no espaço lombo-sacro (L₇-S₁). O posicionamento correto da agulha foi certificado por três sinais: a aspiração de uma gota de NaCl a 0,9% colocada previamente no canhão da agulha, aspiração de ar de uma seringa e administração da anestesia sem resistência no êmbolo da seringa. A injeção dos fármacos pela via peridural foi padronizada no período de um minuto. Após 15 minutos em decúbito esternal, a concentração de isofluorano foi reduzida para 0,8 V% para que se realizasse o pinçamento interdigital dos membros pélvicos a fim de se testar a eficácia do bloqueio. A concentração de isofluorano foi ajustada conforme o requerimento anestésico durante o procedimento cirúrgico em cada animal. A técnica peridural foi conduzida de maneira duplo cega, tanto para os anestesistas avaliadores, como para os cirurgiões.

Os animais foram alocados em três grupos experimentais: GR - grupo controle ropivacaína 1% 0,2 mL/kg, GM50 - grupo midazolam¹⁷ 50 µg/kg + ropivacaína 1%¹⁸ 0,2 mL/kg e GM100 - grupo midazolam 100 µg/kg + ropivacaína 1% 0,2 mL/kg. Nos três grupos foi acrescentada aos fármacos solução fisiológica (NaCl a 0,9%) perfazendo um volume final de 0,3 mL/kg. Desta maneira, todos os animais receberam a ropivacaína na dose de 2 mg/kg,

Os momentos experimentais pré e transoperatórios avaliados foram: M0 – basal; M1 – 15 minutos após a MPA; M2 – 15 minutos após a peridural; M3 – 30 minutos após a peridural; M4 – pinçamento do pedículo ovariano esquerdo; M5 – pinçamento do pedículo ovariano direito; M6 – pinçamento e ligadura do coto uterino; M7 – início da sutura da cavidade; M8 – final da sutura de pele. Foram ainda considerados os seguintes momentos pós-operatórios: MP0 – correspondente ao fim da cirurgia, logo após a extubação; MP1 – 1^a hora após a cirurgia; MP3 – 3^a hora após a cirurgia; MP6 – 6^a hora após a cirurgia e MP12 – 12^a hora após a cirurgia.

Em todos os momentos foram avaliados os parâmetros: frequências cardíaca (FC) e respiratória (*f*); temperatura retal (TR) e pressão arterial sistólica não invasiva por meio de “Doppler” vascular¹⁹ (manguito em membro pélvico esquerdo, respeitando-se a relação de 0,4 entre largura do manguito e o diâmetro do membro). Nos momentos transoperatórios também foram avaliados: volume final de CO₂ expirado (ETCO₂), concentração de isofluorano (V%)

¹¹ Acepran 1% - Univet S/A Ind. Veterinária

¹² Solução de Ringer com lactato, HalexIstar, Goiânia, GO.

¹³ Bomba de Infusão Peristáltica ST550 – Samtronic – São Paulo - SP

¹⁴ Propovan – Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda.

¹⁵ Forine – Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda.

¹⁶ Sistema de Normoterapia Gaymar – Processo Fapesp 2005/02134-8.

¹⁷ Dormire – Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda.

¹⁸ Naropin, 1% – Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda

¹⁹ Doppler Veterinário DV 100 – Microehm – Processo Fapesp 2008/511444-4.

por meio do monitor multiparamétrico²⁰ e saturação de oxigênio na hemoglobina (SpO₂) pelo oxímetro de pulso²¹, com sensor pediátrico colocado na língua dos animais.

A dosagem de cortisol sérico foi realizada em amostras de sangue colhidas nos momentos pós-operatório (M0, MP0, MP1, MP3, MP6 e MP12), mensuradas pela técnica de radioimunoensaio²². Também foi realizada análise hemogasométrica do sangue arterial colhido na artéria femoral nos momentos M2 (após a peridural) e M8 (último ponto da sutura de pele). O grau de sedação foi avaliado nos mesmos momentos que a analgesia (MP0, MP1, MP3, MP6 e MP12) de acordo com estudos descritos por Pascoe e Dyson (10); Pibarot et al. (11), atribuindo-se escores de 0 a 5, onde quanto maior o escore, maior a sedação (Quadro 2).

Quadro 1 - Critérios utilizados para avaliação do grau de analgesia

PARÂMETRO	CRITÉRIO	PONTUAÇÃO
FC, f, PAS	<= 10% maior que o valor pré-operatório	0
	11 a 30% maior que o valor pré-operatório	1
	31 a 50% maior que o valor pré-operatório	2
	50% maior que o valor pré-operatório	3
Salivação	Normal	0
	Acima do normal	1
Pupilas	Normal	0
	Dilatadas	1
Vocalização	Sem Vocalização	0
	Vocalização presente e controlada sem medicação	1
	Vocalização presente não controlada	2
Agitação	Adormecido ou calmo	0
	Leve agitação	1
	Moderada Agitação	2
	Severa Agitação	3
Postura	Decúbito esternal ou movendo-se com tranquilidade	0
	Defendendo e protegendo a área afetada, incluindo posição fetal, ou decúbito lateral	1
Resposta à manipulação da ferida cirúrgica	Sem Resposta	0
	Resposta mínima, tenta esquivar-se	1
	Vira cabeça em direção à ferida cirúrgica, leve vocalização	2
	Vira a cabeça com intenção de morder, severa vocalização	3

(STOBIE et al., 1995 ; BUBACK et al., 1996 ; PIBAROT et al., 1997; BRONDANI et al., 2004)

A analgesia foi avaliada segundo escala de dor numérica, utilizando variáveis objetivas (paramétricas) e subjetivas (não paramétricas) descritas por Stobie et al. (12); Buback, Boothe e Carrol (13); Pibarot et al. (11); Brondani et al. (3), com atribuição de escores de 0 até 3, dependendo da variável (Quadro 1). A pontuação final do escore podia variar de 0 a 14 através da soma dos escores para cada variável. Nessa somatória, valores compreendidos entre 0 e 5 foram interpretados como boa analgesia, entre 6 e 10, discreta analgesia e acima de 10, nenhuma ou mínima analgesia. Todos os animais para os quais a somatória do escore

²⁰ Monitor multiparâmetros Mod Cardiocap 5 marca Datex Ohmeda – processo Fapesp 2005/00858-9

²¹ Oxilife Plus – Cmos Drake do Nordeste.

²² Kit Cout-a-Count DPC / Siemens.

fosse igual ou superior a 6 receberam analgesia complementar (resgate) com tramadol²³ (4,0 mg/kg, via IM).

Quadro 2 - Critérios utilizados para avaliar o grau de sedação.

Parâmetro	Critério	Pontuação
Grau de sedação	Acordado, se mantém em pé e caminha	0
	Mantém-se em pé, mas incoordenado	1
	Tenta mas não consegue se manter em pé	2
	Mantém a cabeça levantada	3
	Somente abre os olhos	4
	Sem resposta	5

(PASCOE e DYSON, 1993; PIBAROT et al., 1997).

Após avaliação da 12^a hora (MP12), foi administrado 4,0 mg/kg de tramadol pela via IM nas cadelas que ainda não haviam recebido analgesia complementar, . Todas receberam meloxicam (0,2 mg/kg, via SC) e enrofloxacina (5,0 mg/kg, via SC) antes de receberem alta. Para os dias posteriores foi prescrito enrofloxacina (5,0 mg/kg, BID, 10 dias) e meloxicam (0,2 mg/kg, SID, 3 dias).

Os dados obtidos foram tabulados pelo programa SAS e analisados considerando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As variáveis que apresentaram distribuição normal e os valores de cortisol após transformação $\log(x+1)$ foram analisadas por análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas através do teste de *Tukey*. As variáveis que não apresentaram distribuição normal e as variáveis qualitativas ordinais (escores) foram analisadas usando o teste *Kruskal-Wallis* para comparar os grupos em cada momento e o teste de *Friedman* para comparar os momentos em cada grupo, seguido do teste de *Dunn* para comparações múltiplas.

RESULTADO E DISCUSSÃO

As variáveis cardiorrespiratórias mantiveram-se em valores aceitáveis durante todo o procedimento apesar de em alguns momentos haverem diferenças significativas (Tabela 1). Em todos os grupos o momento M2 apresentou redução significativa para a variável PAS, coincidindo com o início de efeito da anestesia peridural. Tal achado corrobora com resultados descritos por Albuquerque (14) que relatou maior hipotensão aos 30 minutos após a peridural com ropivacaína devido ao bloqueio simpático. Esta hipotensão também foi relatada com o uso isolado de midazolam pela via peridural (15). Tal alteração poderia contra indicar este tipo de anestesia em pacientes nos quais a redução da pressão arterial possa representar risco (16). A estabilidade das demais variáveis cardiorrespiratórias confirma os relatos de Fantoni e Cortopassi (16) de que a anestesia peridural é um procedimento seguro.

Com relação à temperatura corporal pôde-se observar, no decorrer do período transoperatório, uma redução significativa, o que pode ser atribuído a vários fatores (Tabela 2). A ação do maleato de acepromazina sobre o centro termorregulador e seu efeito vasodilatador periférico como relatado por Massone (17) são causas importantes a serem consideradas. Somam-se a isso a perda de calor para o meio ambiente através da respiração, a utilização de fluido intravenoso em temperatura inferior à corpórea e a exposição da cavidade abdominal como determinantes adicionais desta redução de temperatura (16). O aquecimento foi realizado somente com colchão térmico de água, que não foi suficiente para minimizar a

²³ Tramadon – Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda.

perda de calor. Vale à pena ressaltar, contudo, que nenhum animal apresentou hipotermia grave, não havendo, portanto, importância biológica.

Tabela 1. Média (\bar{x}) e desvio padrão (s) da frequência cardíaca (FC) (batimentos por minuto), pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg) e frequência respiratória (f) (movimentos por minuto) nos diferentes momentos em cadelas submetidas à anestesia peridural com ropivacaína (GR), ropivacaína + midazolam 50 μ g/kg (GM50) e ropivacaína + midazolam 100 μ g/kg (GM100), durante OSH

Momento	Parâmetros ($\bar{x} \pm s$)								
	GR			GM50			GM100		
	FC	PAS	f	FC	PAS	f	FC	PAS	f
M0	92 \pm 9	110 \pm 13a	23 \pm 4	102 \pm 11ab	109 \pm 6	23 \pm 3	105 \pm 17	131 \pm 35a	26 \pm 6
M1	88 \pm 12b	109 \pm 10a	24 \pm 4	104 \pm 19ab	105 \pm 5	28 \pm 4a	98 \pm 14	120 \pm 20ab	28 \pm 5
M2	98 \pm 14	75 \pm 14b	18 \pm 7	89 \pm 19bc	95 \pm 17	32 \pm 7	104 \pm 10	86 \pm 26c	24 \pm 8
M3	96 \pm 10	101 \pm 22a	20 \pm 5	89 \pm 15bc	108 \pm 21	21 \pm 2	89 \pm 20	93 \pm 20bc	21 \pm 5
M4	98 \pm 14	106 \pm 26a	22 \pm 14	97 \pm 9	121 \pm 29a	20 \pm 5	105 \pm 20	120 \pm 21ab	18 \pm 8
M5	104 \pm 15a	111 \pm 27a	24 \pm 15	107 \pm 13a	120 \pm 1a	20 \pm 7	106 \pm 15	114 \pm 23ab	18 \pm 8
M6	98 \pm 13	106 \pm 23a	20 \pm 12	99 \pm 10	113 \pm 13	19 \pm 5b	96 \pm 11	115 \pm 21ab	19 \pm 7
M7	96 \pm 11	98 \pm 18a	21 \pm 9	82 \pm 13cB	109 \pm 19	19 \pm 2b	98 \pm 14A	109 \pm 26ab	20 \pm 7
M8	100 \pm 12	94 \pm 15	23 \pm 08	85 \pm 13c	104 \pm 19	20 \pm 2bB	105 \pm 25	108 \pm 12ab	27 \pm 3A

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (FC e PAS) e pelo teste de Dunn (f) ($P > 0,05$).

Tabela 2. Média (\bar{x}) e desvio padrão (s) da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) nos diferentes momentos em cadelas submetidas à anestesia peridural com ropivacaína (GR), ropivacaína + midazolam 50 μ g/kg (GM50) e ropivacaína + midazolam 100 μ g/kg (GM100), durante OSH

Momento	Temperatura corporal ($\bar{x} \pm s$)		
	GR	GM50	GM100
M0	38,0 \pm 0,5a	38,3 \pm 0,5a	38,0 \pm 0,5a
M1	37,8 \pm 0,5ab	38,1 \pm 0,6a	37,8 \pm 0,4a
M2	37,3 \pm 0,7bc	37,7 \pm 0,6b	37,2 \pm 0,7b
M3	36,9 \pm 0,7cd	37,3 \pm 0,5c	36,8 \pm 0,7bc
M4	36,7 \pm 0,8de	37,2 \pm 0,5c	36,8 \pm 0,6 bc
M5	36,8 \pm 0,7cde	37,2 \pm 0,5c	36,8 \pm 0,7 bc
M6	36,5 \pm 0,6de	37,1 \pm 0,5c	36,7 \pm 0,6 c
M7	36,4 \pm 0,6de	37,1 \pm 0,5c	36,7 \pm 0,6 c
M8	36,2 \pm 0,7e	37,0 \pm 0,5c	36,5 \pm 0,7 c

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Os valores de ETCO₂ durante todo o procedimento anestésico se mantiveram dentro dos esperados para a espécie (34,5 \pm 4,1 a 40,5 \pm 2,7 mmHg) de maneira semelhante ao relatado por Maia (18) ao observar poucos efeitos nesta variável ao utilizar a ropivacaína pela via peridural em cães.

As variáveis hemogasométricas, apesar de algumas alterações significativas entre momentos, não ultrapassaram os limites considerados fisiológicos para a espécie canina, semelhantemente ao descrito por Albuquerque (14), Maia (18) e Silva et al. (19) e que também utilizaram a ropivacaína pela mesma via em cadelas (Tabela 3). Tais achados demonstram não ter ocorrido depressão respiratória ou desequilíbrio ácido-básico de importância clínica.

A PaO₂ se manteve elevada assim como o SpO₂ devido ao fornecimento de O₂ a 100% como fluxo diluente do anestésico inalatório (Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente).

O requerimento anestésico de isoflurano foi maior durante a ligadura dos pedículos ovarianos em alguns animais, fato este, devido ao bloqueio não ter atingido as inervações ovarianas que partem do terceiro e quarto nervos lombares (20), corroborando com Cassu et al. (21), que ao associarem lidocaína em alta dose (8,5 mg/kg) ao fentanil não conseguiram realizar cirurgias de OSH em 40% dos animais, necessitando complementação anestésica com propofol. Da mesma maneira, Albuquerque (14) verificou que a ropivacaína aplicada de maneira isolada pela via peridural não permitiu a realização de OSH sem complementação anestésica.

Tabela 3. Média (\bar{x}) e desvio padrão (s) do potencial hidrogeniônico (pH), pressão parcial de oxigênio (PaO₂), pressão parcial de dióxido de carbono (PaCO₂), bicarbonato (HCO₃), déficit de base (BE) em M2 e M8 em cadelas submetidas à anestesia peridural com ropivacaína (GR), ropivacaína + midazolam 50µg/kg (GM50) e ropivacaína + midazolam 100µg/kg (GM100), durante OSH

Parâmetros ($\bar{x} \pm s$)	Momento	Grupos		
		GR	GM50	GM100
pH	M2	7,357 ± 0,039	7,338 ± 0,028	7,356 ± 0,063
	M8	7,342 ± 0,059	7,343 ± 0,057	7,347 ± 0,049
PaO ₂ (mmHg)	M2	638,8 ± 8,7b	639,3 ± 7,2	643,1 ± 8,9
	M8	650,0 ± 9,3 aA	638,7 ± 7,4B	645,9 ± 2,9
PaCO ₂ (mmHg)	M2	40,5 ± 8,2	39,1 ± 4,8	36,3 ± 8,1
	M8	35,4 ± 6,0	43,0 ± 8,7A	33,1 ± 2,7B
HCO ₃ (mmol/L)	M2	19,9 ± 2,2	21,4 ± 2,3	19,7 ± 2,4
	M8	20,0 ± 2,2B	22,7 ± 2,6A	19,6 ± 0,9B
BE (mmol/L)	M2	-4,9 ± 1,1a	-5,0 ± 1,1	-4,0 ± 1,7b
	M8	-5,6 ± 1,1bB	-4,8 ± 1,0	-2,9 ± 2,0aA

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Tabela 4- Média (\bar{x}) e desvio padrão (s) da saturação de oxigênio na hemoglobina (SpO₂) em diferentes momentos em cadelas submetidas à anestesia peridural com ropivacaína (GR), ropivacaína + midazolam 50µg/kg (GM50) e ropivacaína + midazolam 100µg/kg (GM100), durante OSH

Momento	SpO ₂ ($\bar{x} \pm s$)		
	GR	GM50	GM100
M2	97,9 ± 0,6b	97,8 ± 0,7c	98,6 ± 0,7
M3	98,1 ± 1,0	97,6 ± 0,7bc	97,9 ± 3,2
M4	98,4 ± 0,7	98,4 ± 0,7	98,5 ± 1,1
M5	98,6 ± 0,5a	98,3 ± 0,5	98,5 ± 1,1
M6	98,8 ± 0,5a	98,5 ± 0,5ab	98,8 ± 0,5
M7	98,5 ± 0,5	98,4 ± 0,7ab	98,8 ± 0,5
M8	98,6 ± 0,5a	98,8 ± 0,5a	98,8 ± 0,5

Médias seguidas de letras diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Os achados do presente trabalho demonstram que o midazolam pela via peridural não produz efeito sedativo residual no período pós-operatório, pois a sedação em todos os grupos foi semelhante. Levando-se em conta a meia-vida do midazolam em relação aos momentos avaliados para sedação, provavelmente os efeitos deste fármaco já seriam mínimos ou ausentes no período pós-operatório, segundo estudo de Nishiyama, Tamai e Hanaoka (15) em cães. Tais autores relataram que 97% do midazolam administrado pela via peridural atinge

rapidamente a corrente circulatória e os outros 3% difundiram-se no líquido cérebro-espinhal, sendo que a partir de 90 minutos as concentrações em ambos os compartimentos celulares foram baixas, apresentando valores inferiores após 240 minutos da aplicação. Neste estudo os animais apresentaram menores escores de sedação aos 240 minutos após a administração peridural de midazolam (MP3). A sedação observada no período pós-operatório provavelmente foi ocasionada pelo efeito residual da medicação pré-anestésica (16) (Tabela 5).

A intensidade analgésica observada foi diferente das encontradas por Nishiyama et al. (8); Nishiyama, Matsukawa e Hanaoka (22). Entretanto Naguib et al. (9) preconizam a dose de 50µg/kg de midazolam em humanos, diferente do presente estudo onde 100µg/kg produziram clinicamente efeitos analgésicos mais duradouros do que 50µg/kg.

Dentre os animais pertencentes ao grupo GM100, 50% necessitaram de analgesia resgate 12 horas após a cirurgia (aproximadamente 13 horas após peridural), resultados próximos aos descritos por Agrawal et al. (23) que relataram analgesia de até 24 horas (média de 17 horas) com o uso do midazolam na dose de 100µg/kg. Entretanto Kim e Lee (24) observaram incremento analgésico de 2 e 4,5 horas com 100 e 200µg/kg, respectivamente. Os primeiros momentos no grupo GR, onde houve necessidade de resgate analgésico, coincidem com o término do efeito da ropivacaína (14, 19). Pôde-se notar que nos grupos que receberam a adição de midazolam, o efeito analgésico da ropivacaína foi prolongado corroborando com o estudo de Agrawal et al. (23) (Tabela 6).

Tabela 5. Escores medianos de sedação, em cadelas submetidas à anestesia peridural com ropivacaína (GR), ropivacaína + midazolam 50µg/kg (GM50) e ropivacaína + midazolam 100µg/kg (GM100), durante OSH

Momento	Escore mediano de sedação		
	GR	GM50	GM100
MP0	5 a	4 a	5 a
MP1	3 ab	3 ab	3 ab
MP3	2	3 ab	3
MP6	2 bc	2 bc	1 bc
MP12	0 c	0 c	0 c

Medianas seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Dunn ($P > 0,05$).

Tabela 6. Escores medianos de analgesia, de cadelas submetidas à anestesia peridural com ropivacaína (GR), ropivacaína + midazolam 50µg/kg (GM50) e ropivacaína + midazolam 100µg/kg (GM100), durante OSH

Momento	Escore mediano de analgesia		
	GR	GM50	GM100
MP0	0 b	0 b	1 b
MP1	2 b	2 b	3 b
MP3	3	3	2
MP6	6 a	5 a	3
MP12	6 a	6 a	6 a

Medianas seguidas de letra minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem entre si pelo teste de Dunn ($P > 0,05$).

O cortisol variou conforme descritos por Caldeira et al. (25), mas o pico na concentração sérica nos 3 grupos ocorreu aos 180 minutos (MP3) após a cirurgia, diferentemente de Caldeira et al. (25) que observaram maior pico 120 minutos após a peridural. O presente estudo corrobora com resultados obtidos por Dobbins, Brown e Shofer (26) e Mastrocinque (27) que observaram concentrações séricas mais elevadas de cortisol

entre 120 e 240 minutos após a cirurgia devido, provavelmente, à sensibilização mais intensa dos nociceptores periféricos por substâncias algogênicas presentes no processo inflamatório da ferida cirúrgica. A alteração da sensibilização periférica por efeito de mediadores químicos também foi referida por Lamont, Tranquilli e Grimm (28); Raffe (29) e Sackman (30). O midazolam aumentou o período analgésico do anestésico local e os níveis séricos de cortisol puderam realmente sugerir tal incremento, apesar de não diferirem estatisticamente, observou-se clinicamente maior analgesia nos animais que receberam o midazolam (Tabela 7).

Tabela 7. Média (\bar{x}) e desvio padrão (s) do cortisol sérico, em nanogramas por decilitro (ng/dl), segundo os grupos em cada momento de avaliação de cadelas submetidas à anestesia peridural com ropivacaína (GR), ropivacaína + midazolam 50 μ g/kg (GM50) e ropivacaína + midazolam 100 μ g/kg (GM100), durante OSH.

Momento	Cortisol ($\bar{x} \pm s$)		
	GR	GM50	GM100
M0	3,93 \pm 1,77 c	2,89 \pm 2,09 c	5,96 \pm 2,82 ab
MP0	6,24 \pm 2,28	5,77 \pm 2,84 ab	7,83 \pm 2,97 a
MP1	8,42 \pm 2,74 a	7,64 \pm 2,18 a	7,81 \pm 3,37 a
MP3	7,56 \pm 2,01 ab	7,07 \pm 2,49 a	7,74 \pm 2,06 a
MP6	4,76 \pm 1,56	5,54 \pm 1,60 ab	5,18 \pm 2,53
MP12	4,32 \pm 1,83 bc	3,15 \pm 1,50 bc	3,58 \pm 2,62 b

Médias seguidas de letra na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

CONCLUSÕES

Concluiu-se que o midazolam na dose de 100 μ g/kg associado à ropivacaína pode ser mais uma opção no tratamento pós-operatório anti-álgico em cadelas submetidas à OSH e, apesar de não potencializar o efeito analgésico, prolongou o período de analgesia residual pós-operatória conferida pelo anestésico local ropivacaína, possibilitando uma anestesia segura e mais duradoura.

Agradecimento à FAPESP pelo auxílio Pesquisa.

Agradecimento à Professora Silvia Helena Venturolli Perri pelo auxílio estatístico.

Trabalho aprovado em 05 de março de 2008 pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Unesp – Araçatuba, sob o protocolo 009207, estando de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

REFERÊNCIAS

1. He L. Involvement of endogenous opioids peptides in acupuncture analgesia. *Pain*. 1987;1:99-121.
2. Tranquilli WJ, Grimm KA, Lamont LA. Tratamento da dor para o clínico de pequenos animais. São Paulo: Roca; 2005.
3. Brondani JT, Natalini CC, Raiser AG, Mazzanti A, Prati L. Analgesia epidural com clonidina ou romifidina em cães submetidos à cirurgia coxofemoral. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2004;2:175-82.

4. Marucio R, Luna SPL, Teixeira Neto FJ, Minto BW, Hatschbach E. Analgesic effects of epidural neostigmine with or without morphine after ovariohysterectomy in dogs. In: Proceedings of the 9th Congress of Veterinary Anaesthesia; 2006, Santos. Santos: Brazilian Journal of Veterinary Research; 2006. p.179.
5. Torske KE, Dyson DH. Epidural analgesia and anesthesia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2000;30:860-73.
6. Lin D, Becker K, Shapiro HM. Neurologic changes following epidural injection of potassium chloride and diazepam: a case report with laboratory correlations. *Anesthesiology.* 1986;2:210-2.
7. Nishiyama T, Hirasaki A, Odaka Y, Konishi H, Seto K, Goto I. Epidural midazolam with saline – optimal dose for postoperative pain. *Jpn J Anesthesiol.* 1991;1:49-54.
8. Nishiyama T, Hirasalo A, Odaka Y, Mikane T, Kobayashu O, Seto K. Epidural midazolam with bupivacaine – Optimal dose for postoperative pain. *Jpn J Anesthesiol.* 1992;7:1113-8.
9. Naguib M, Gammal ME, Elhattab YS, Seraj M. Midazolam for caudal analgesia in children: comparison with caudal bupivacaine. *Can J Anaesth.* 1995;9:758-4.
10. Pascoe PJ, Dyson DH. Analgesia after lateral thoracotomy in dogs. Epidural morphine vs. intercostal bupivacaine. *Vet Surg.* 1993;2:141-7.
11. Pibarot P, Dupuis J, Grisneaux E, Cuvellez S, Plante J, Beauregard G, et al. Comparison of ketoprofen, oxymorphone, and butorphanol in the treatment of postoperative pain in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1997;4:438-44.
12. Stobie D, Caywood DD, Rozanski EA, Bing DR, Dhokarika P, Raffe MR, et al. Evaluation of pulmonary function and analgesia in dogs after intercostals thoracotomy and use of morphine administered intramuscularly or intrapleurally and bupivacaine administered intrapleurally. *Am J Vet Res.* 1995;8:1098-109.
13. Buback JL, Boothe HW, Carrol GL. Comparasion of three methods for relief of pain after ear canal ablation in dogs. *Vet Surg.* 1996;3:380-5.
14. Albuquerque VB. Ropivacaína isolada ou associada à morfina, butorfanol ou tramadol pela via peridural em cadelas para realização de ovariosalpingohisterectomia [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista; 2008.
15. Nishiyama T, Tamai H, Hanaoka K. Serum and cerebrospinal fluid concentrations of midazolam after epidural administration in dogs. *Anesth Analg.* 2003;3:159-62.
16. Fantoni DT, Cortopassi SRG. Anestesia em cães e gatos. São Paulo: Roca; 2002.
17. Massone F. Anestesiologia veterinária. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
18. Maia CAA. Avaliação cardiorrespiratória e analgésica da ropivacaína associada à morfina, petidina ou butorfanol administrada pela via peridural em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2006.

19. Silva BM, Matsubara LM, Albuquerque VB, Maia CAA, Oliva VNLS. Ropivacaína isolada e associada ao fentanil ou ao tramadol administrados pela via peridural em cães. *Cienc Rural*. 2008; 38:2197-202.
20. Ellenport CR. Aparelho urogenital do carnívoro. In: Sisson S, Grossman JD, editors. *Anatomia dos animais domésticos*. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1986. p.1481-93.
21. Cassu RN, Stevanin H, Kanashiro C, Menezes LMB, Laposy C. Anestesia epidural com lidocaína isolada e associada ao fentanil para realização de ovariosalpingohisterectomia em cadelas. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2008;4:825-31.
22. Nishiyama T, Matsukawa T, Hanaoka K. Continuous epidural administration of midazolam and bupivacaine for postoperative analgesia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1999;3:568-72.
23. Agrawal N, Usmani R, Sehgal R, Kumar R, Bhadoria P. Effect of intrathecal midazolam bupivacaine combination on post operative analgesia. *Indian J Anaesth*. 2005;1:37-9.
24. Kim MH, Lee YM. Intrathecal midazolam increases the analgesic effects of spinal blockade with bupivacaine in patients undergoing haemorrhoidectomy. *Br J Anaesth*. 2001;1:77-9.
25. Caldeira FMC, Oliveira HP, Melo EG, Martins C, Vieira MS, Silva CN. Cortisol sérico e glicemia em cadelas tratadas com tramadol e submetidas a ovário-histerectomia. *Cienc Rural*. 2006;1:155-60.
26. Dobbins S, Brown NO, Shofer FS. Comparison of the effects of buprenorphine oxymorphone hydrochloride and ketoprofen for postoperative analgesia after onychectomy or onychectomy and sterilization in cats. *J Am Vet Med Assoc*. 2002;6:507-14.
27. Mastrocinque S. Avaliação do emprego do tramadol epidural ou sistêmico e da morfina epidural em cadelas submetidas à ovariohisterectomia [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2005.
28. Lamont LA, Tranquilli WI, Grimm KA. Physiology of pain. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2000;4:703-28.
29. Raffe M. Recent advances in our understanding of pain: how should they affect management? *Semin Vet Med Surg Small Anim*. 1997;12:75-9.
30. Sackman JE. Pain: its perception and alleviation in dogs and cats. Part I: the physiologic of pain. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 1991;13:71-9.

Recebido em: 14/08/10

Aceito em: 27/11/12

Comitê de Avaliadores

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

Marcos Amaku
Marcos Chalhoub Coelho Lima
Marcos Jun Watanabe
Marcos Veiga dos Santos
Margareth Elide Genovez
Maria Angélica Miglino
Maria Cecília Rui Luvizotto
Maria da Glória Buzinaro
Maria de Lourdes R. S. da Cunha
Maria Denise Lopes
Maria Gisela Laranjeira
Maria Jaqueline Manprim
Maria Lucia Gomes Lorenço
Maria Lúcia Zaidan Dagli
Maria Luiza Delavechia
Maria Madalena Pessoa Guerra
Maria Terezinha S. Peraçoli
Márcia Valéria Rizzo S. Szabó
Maria Verônica de Souza
Marilena Longo Büll
Marília Martins Melo
Marion Burkhardt de Koivisto
Mary Marcondes
Mauricio Costa Alves da Silva
Mayra Elena O. D'Avila Assumpção
Milton Hissashi Yamamura
Mitika Kuribayashi Hagiwara
Mônica Vicky Bahr Arias
Nei Moreira
Nelson Carneiro Baião
Nelson Moraes
Nereu Carlos Preste
Nilson Roberto Benites
Noeme Sousa Rocha
Oswaldo Durival Rossi Junior
Pacífico Antônio Diniz Belém
Paulo Alberto Lovatto
Paulo César Ciarlini
Paulo Fernando Machado
Paulo Francisco Domingues
Paulo Henrique Franceschini
Paulo Henrique Jorge da Cunha
Paulo Michel Roehle
Paulo Roberto Brandão
Paulo Roberto de Lima Meirelles
Paulo Roberto Rodrigues Ramos
Pedro Manuel Leal Germano
Peterson Triches Dornbusch
Priscilla Anne Melville
Raimundo Souza Lopes
Raphael Lúcio Andreatti Filho
Raquel Y. A. Baccarim
Raul Franzolin Neto
Raul José Silva Giro
Regina Kiomi Takahira
Renato Campanarut Barnabé
Renato Cesar Sacchetto Tôres
Renato Silva de Sousa
René Laufer Amorim
Ricardo Augusto Mendonça Vieira
Ricardo de Oliveira Orsi
Ricardo J. Del Carlo
Roberta Lemos Freire
Roberto Antonio Rodella
Roberto Calderón Gonçalves
Roberto de Oliveira Roça
Roberto Sartori Filho
Roberto Soares de Castro
Rodrigo Martins Soares
Rodrigo Otávio Silveira Silva
Rogério de Paula Lana
Rogério Giufrida
Rogério Martins Amorim
Ronaldo Lopes Oliveira
Rosana M. O. Clark
Rosângela Zacarias Machado
Rosângela Locatelli Dittrich
Ruben Pablo Schocken-Iturrino
Rubens Antônio Carneiro
Samir Issa Samara
Sandra de Moraes Gimenes Bosco
Sandra Mara Araújo Crispim
Sebastião de Campos Valadares Filho
Sergio Borges Mano
Sheila Canavese Rahal
Sílvia M. Nishida
Sílvia Maria Alves Gomes
Simone Baldini Lucheis
Simone de Carvalho Balian
Simone Tostes de Oliveira
Sonia Regina Pinheiro
Sony Dimas Bicudo
Stefano Hagen
Stélio Pacca Loureiro Luna
Teresa C. G. de O. Siqueira
Tereza Cristina C. da Silva
Tilde Rodrigues Froes
Valéria Marçal Félix de Lima
Valéria Nobre L. S. Oliva
Vamilton Alvares Santarém
Vanerli Beloti
Vania Maria de V. Machado
Venício José de Andrade
Vera Lúcia M. Hall
Victor Cruz Rodrigues
Virgínia Bodelão Richini Pereira
Wagner dos Reis
Wagner Luis Ferreira
William Koury Filho
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. Freqüência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organización como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Libro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Capítulo en libro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2^a ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

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

5 Ponencias o conferencias en simposio, congreso, reuniones, etc .

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

6 Tesis

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

7 Medios electrónicos en Internet

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