

# **Veterinária e Zootecnia**

**Vet e Zootec.**

**2013 março; 20(1): 001-151**

**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**

**ISSN Impresso 0102 -5716**

**ISSN Eletrônico 2178-3764**

**Botucatu - SP – Brasil**

## Veterinária e Zootecnia

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

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

Publicação trimestral  
Solicita-se permuta / *Exchange desired*  
Biblioteca do Campus de Botucatu  
18618-970 – 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:  
Current Awareness in Biological Sciences; Index Veterinarius; Veterinary Bulletin.  
PERIÓDICA: Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciências; Cambridge Scientific  
Abstracts; Biosis; CAB Abstracts.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Administração Geral da UNESP**

**Reitor**

Prof. Dr. Julio Cezar Durigan

**Vice-Reitor**

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

**Pró-Reitor de Pesquisa**

Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

**Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Prof. Dr. Eduardo Kokubun

**Pró-Reitor de Graduação**

Prof. Dr. Laurence Duarte Colvara

**Pró-Reitor de Extensão Universitária**

Profa. Dra. Mariângela Spotti Lopes Fujita

**Pró-Reitor de Administração**

Prof. Dr. Carlos Antonio Gamero

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**Administração da FMVZ**

**Diretor**

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

**Vice-Diretor**

Prof. Dr. Maria Denise Lopes

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

## EXPEDIENTE

### Comissão Editorial

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

### Assessoria Técnica

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

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

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

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

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

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

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

**Prof. Dr. Helio Langoni**

**Revista “Veterinária e Zootecnia”**

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

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

## Corpo Editorial

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

## SUMÁRIO/CONTENTS/SUMARIO

EDITORIAL .....9

## ARTIGOS DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE/ARTÍCULOS DE REVISIÓN

**AVALIAÇÃO DOS DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS E DOS DIFERENTES MARCADORES PROGNÓSTICOS CLÍNICO-LABORATORIAIS EM CÃES COM ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNO-MEDIADA/ ASSESSMENT OF HEMOSTATIC DISORDERS AND DIFFERENT CLINICAL AND LABORATORY PROGNOSTIC MARKERS IN DOGS WITH IMMUNE-MEDIATED HEMOLYTIC ANEMIA / EVALUACIÓN DE LOS DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS Y DE LOS DIFERENTES MARCADORES DE LABORATORIO CLÍNICO EN PERROS CON ANEMIA HEMOLÍTICA INMUNOMEDIADA.** Livia Fagundes Moraes, Regina Kiomi Takahira .....10

**SUPLEMENTAÇÃO DA AMOREIRA NA ALIMENTAÇÃO DO *Bombyx mori* L./ SUPPLEMENTATION OF MULBERRY IN FEEDING OF *Bombyx mori* L. / COMPLEMENTACIÓN CON MORERA PARA LA ALIMENTACIÓN DE *Bombyx mori* L.** Antonio José Porto.....20

**DIAGNÓSTICO DA HIDROCEFALIA EM ANIMAIS PELA ULTRASSONOGRAFIA, TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA. / HYDROCEPHALUS DIAGNOSIS IN ANIMALS USING ULTRASONOGRAPHY, COMPUTERIZED TOMOGRAPHY AND MAGNETIC RESONANCE. / DIAGNÓSTICO DE HIDROCEFALIA EN ANIMALES MEDIANTE EL USO DE ECOGRAFÍA, TOMOGRAFÍA COMPUTADA Y RESONANCIA MAGNÉTICA.** Alexandra Frey Belotta, Vânia Maria de Vasconcelos Machado, Luiz Carlos Vulcano.....33

## RELATOS DE CASO/ CASE REPORTS/ ESTUDIOS DE CASO

**SUPPURATIVE SIALADENITIS IN MANDIBULAR GLAND OF A DOG - ULTRASONOGRAPHIC ASPECT. / SIALOADENITE SUPURATIVA EM GLÂNDULA MANDIBULAR DE UM CÃO - ASPECTO ULTRASSONOGRÁFICO. / SIALOADENITIS SUPURATIVA EN GLÂNDULA MANDIBULAR DE UN PERRO - ASPECTO ECOGRÁFICO** Viviam Rocco Babicsak, Vanesa Kutz Arruda, Maria Claudia Lopes Silva, Maria Lucia Gomes Lourenço, Noeme Sousa Rocha, Luiz Carlos Vulcano, Maria Jaqueline Mamprim.....42

**COMPLICAÇÕES PÓS-CIRÚRGICAS APÓS A EXCIÇÃO DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS NA REGIÃO PERIANAL EM FÊMEA EQUINA. / POST-SURGICAL COMPLICATIONS AFTER PERIANAL AND PERIVULVAR SQUAMOUS CELLS CARCINOMA RESECTION IN MARE. / LAS COMPLICACIONES POSTQUIRÚRGICAS DESPUÉS DE RESECCIÓN DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS PERIANAL Y PERIVULVAR EN MAR.** Rogério Elias Rabelo, Valcinir Aloísio Scalla Vulcani, Fabiano José Ferreira de Sant'Ana, Felipe Roncatto Vicentin, Panmera Almeida Helrigel, Juliana Ferreira Batista .....47

**PARASITISM BY *Diectophyme renale* (GOEZE, 1782) IN MANED WOLF (*Chrysocyon brachyurus*), BRAZIL. / PARASITISMO POR *Diectophyme renale* (GOEZE, 1782) EM LOBO-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*), BRASIL. / PARASITISMO POR *Diectophyme renale* (GOEZE, 1782) EN UN LOBO COLORADO (*Chrysocyon brachyurus*), BRASIL.** Janaina Duarte, Adriana Miranda Bezerra Costa, Satie Katagiri, Jéssica Amancio Martins, Maria Elena Oliveira, Claudia Mello Ribeiro .....52

**APRESENTAÇÃO ATÍPICA DE TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CUTÂNEO EM UM CÃO. / CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR IN A DOG WITH SINGLE EXTRAGENITAL LOCATION. / LOCALIZACIÓN CUTÁNEA DE TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE EN UN PERRO.** Tiago Barbalho Lima, Paulo Vinícius Tertuliano Marinho, Raphael Nikolas Lira, Paulo César Jark, Jairo Ferreira Passino Melo, Luiz Carlos Rêgo Oliveira .....57

## COMUNICAÇÃO/ COMMUNICATION/ COMUNICACIÓN

**CANDIDA PARAPSILOSIS AS VERO CELL CULTURE CONTAMINANT IN NEOSPORACANINUM ANTIGEN PRODUCTION/ CANDIDA PARAPSILOSIS COMO CONTAMINANTE DE CULTURA DE CÉLULAS VERO NA PRODUÇÃO DE ANTÍGENO DE NEOSPORACANINUM CANDIDA PARAPSILOSIS COMO CONTAMINANTE DE CULTIVOS CELULARES VERO EN LA PRODUCCIÓN DE NEOSPORACANINUM ANTIGEN.** Raíssa Vasconcelos Cavalcante, Mariana Kikuti, Virginia Bodelão Richini-Pereira, Helio Langoni.....62

**AUSÊNCIA DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA SALMONELLA ENTERITIDIS EM AMOSTRAS DE AMBIENTES AVÍCOLAS NO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO. / ABSENCE OF SALMONELLA ENTERITIDIS LYTC BACTERIOPHAGES IN SAMPLES FROM POULTRY IN THE NORTHWEST REGION OF SAO PAULO STATE. / AUSENCIA DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS DE SALMONELLA ENTERITIDIS DE ORIGEN AVIAR EN LA REGIÓN NOROESTE DE SÃO PAULO.** Guilherme Augusto Marietto Gonçalves, Bianca Yuri Borges Suehiro, Keila Carolina de Ornellas Garcia Dutka, Luis Felipe Zuccolo Paschoal da Costa, Raphael Lucio Andreatti Filho.....66

**IMPORTÂNCIA DO EXAME COPROLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DA EURITREMATOSE BOVINA. / IMPORTANCE OF COPROLOGY TEST IN THE DIAGNOSIS OF BOVINE EURYTREMATOSIS / IMPORTANCIA DEL EXAMEN COPROPARASITOSCÓPICO EN EL DIAGNÓSTICO DE EURYTREMATOSIS BOVINA.** Claudia Mello Ribeiro, Débora Elenice de Lima, Satie Katagiri .....70

## ARTIGOS/ARTICLES/ARTÍCULOS

**ASPECTOS RELACIONADOS COM A RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS DA RAÇA BRASILEIRO DE HIPISMO, UTILIZADAS EM PROGRAMA COMERCIAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO. / SOME RELEVANT FACTORS REGARDING EMBRYONIC RECOVERY RATES IN A PROGRAM OF EMBRYO TRANSFER IN BRAZILIAN JUMPING HORSE MARES. / FACTORES RELACIONADOS CON LA RECUPERACIÓN EMBRIONARIA EN YEGUAS DE LA RAZA BRASILEÑO DE HIPISMO UTILIZADAS EN PROGRAMAS COMERCIALES DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.** Carlos Eduardo Camargo, Romildo Romualdo Weiss, Luiz Ernandes Kozicki, Marília Pastoello Duarte, Mario Cesar Garcia Duarte, Melina Andrea Formighieri Bertol, Francisco Romano Gaievski, Guilherme de Medeiros Bastos .....74

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE PARATORMÔNIO INTACTO EM CÃES/ EVALUATION OF CHEMILUMINESCENT ASSAY ON DETERMINATION OF INTACT PARATHORMONE IN DOGS / VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE QUIMIOLUMINISCENCIA PARA LA DETERMINACIÓN DE PARATHORMONA INTACTA EN PERROS.** Luiz Henrique de Araújo Machado, Flávio Quaresma Moutinho.....84

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS EM PASTAGENS DE CAPIM XARAÉS NO PERÍODO DAS ÁGUAS. / SUPPLEMENTATION FOR DAIRY CATTLE IN XARAÉS GRASS PASTURE IN RAINY SEASON. / SUPLEMENTACIÓN DE VACAS LECHERAS MANTENIDAS EN PASTO XARAÉS DURANTE EL PERIODO DE LLUVIAS.** Daniel Marino Guedes de Carvalho, Luciano da Silva Cabral, Janaina Januarino da Silva, Renato Esteves Sandri, Ricardo Alessandro Baez Gomes, Moises Zorzeto Neto, Aristóteles de Jesus Teixeira Filho .....91

**MICROBIOTA BACTERIANA E FÚNGICA PRESENTES NA CLOACA DE JABUTIS-PIRANGA (Geochelone carbonaria) CRIADOS EM DOMICÍLIO. / BACTERIAL AND FUNGAL MICROFLORA PRESENT IN THE CLOACAE OF DOMESTICALLY KEPT RED-FOOTED TORTOISES (Geochelone carbonaria). / MICROBIOTA BACTERIANA Y FÚNGICA PRESENTES EN LA CLOACA DE TORTUGAS (Geochelone carbonaria) CRIADAS COMO ANIMALES DOMÉSTICOS.** Nilson Roberti Benites, Carlos Pessoa, Luciana Bandini, André Saldenberg, Andrea Moreno, Sonia Sakata, Cleise Gomes, Priscilla Melville .....102

- ROIIVACAÍNA ISOLADA OU ASSOCIADA À MORFINA, BUTORFANOL OU TRAMADOL PELA VIA PERIDURAL EM CADELAS PARA REALIZAÇÃO DE OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA. / ROIIVACAINE SOLE OR ASSOCIATED WITH MORPHINE, BUTORPHANOL OR TRAMADOL BY EPIDURAL INJECTED IN THE BITCHES FOR OVARIOSALPINGOHISTERCTOMY ACCOMPLISHMENT. / ROIIVACAINA AISLADA O ASOCIADA A LA MORFINA, BUTORFANOL O TRAMADOL POR VÍA PERIDURAL EN PERRAS PARA REALIZACIÓN DE OVARIOSALPINGOHISTERECTOMÍA.** Verônica Batista de Albuquerque, Talita Floering Brêda Souza, Maria Carolina Ribeiro Vivan, Joana Zafalon Ferreira, Marcelo Carnelli Frade, Silvia Helena Venturolli Perri, Valéria Nobre Leal de Souza Oliva .....111
- AVALIAÇÃO SOROLÓGICA PARA *Neospora caninum* EM PROPRIEDADES DE BOVINOS LEITEIROS COM ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS. / SEROLOGICAL EVALUATION FOR *Neospora caninum* IN FARMS WITH DAIRY CATTLE SHOWING REPRODUCTIVE ALTERATIONS / EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE *Neospora caninum* EN PROPIEDADES DE BOVINOS LECHEROS CON ALTERACIONES REPRODUCTIVAS.** Helio Langoni, Aristeu Vieira da Silva, Satie Katagiri, Franki Cagnini, Claudia Mello Ribeiro .....124
- ACEITABILIDADE DE IOGURTE DE LEITE DE OVELHA COM ADIÇÃO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.). / ACCEPTABILITY OF YOGURT OF SHEEP'S MILK WITH ADDITION OF ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis* L.). / ACEPTABILIDAD DE YOGUR DE LECHE DE OVEJA CON ADICIÓN DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.).** Natalia Santos Leal Francy Zambrano, Luciane do Carmo Seraphim, Lucas Schimidt Dibbern, Luis Carlos Ferreira de Almeida, Simone Fernandes .....131

## EDITORIAL

### HUMANOS E ANIMAIS

Esta relação se torna a cada dia mais evidente, e chama atenção para muitos aspectos que devem trazer reflexão. Se por um lado os animais domésticos com destaque os PET, como cães e gatos fazem a alegria de muitos lares e pessoas contribuindo para o melhor desenvolvimento de crianças, inclusive do ponto de vista cognitivo, por outro é preciso entender que há aspectos de bem estar animal e de saúde pública que devem ser respeitados, para que esta relação seja saudável e sem sofrimentos para estes animais.

Preservar o bem estar animal apoiando-se nos aspectos de saúde pública é um dever do Médico Veterinário e também do Zootecnista. Deve-se ter a consciência da importância da atividade educativa no que concerne à orientação para a guarda responsável dos animais como prevenção do abandono destes animais, além dos cuidados e responsabilidades como realização de exames periódicos por médico veterinário, os cuidados com vermífugos, vacinas, alimentação adequada, higienização com banhos periódicos, entre outros cuidados importantes.

Todos os proprietários de animais, devem levar a sério o bem estar animal, tratando o seu animal com todo cuidado, e respeito que ele merece. Cabe ressaltar que as ações de controle da população urbana de cães e gatos, está centrada na saúde dos animais, mas principalmente na saúde pública para evitar a disseminação de doenças, garantindo assim o bem estar dos animais e também da população.

Frisamos que um animal nunca deve ser abandonado pois isto é um ato de insensibilidade e crueldade com um ser indefeso. Esta atitude é considerada crime e tem punições previstas na lei 9605/1998. É bom lembrar que um animal abandonado causa transtornos à população por causar acidentes no trânsito, além de transmitir diferentes zoonoses.

Este número da revista traz três artigos de revisão: Avaliação dos distúrbios hemostáticos e dos diferentes marcadores prognósticos clínico-laboratoriais em cães com anemia hemolítica imuno-mediada; Suplementação da amoreira na alimentação do *bombyx mori* L.; e Diagnóstico da hidrocefalia em animais pela ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética. Quatro relatos de caso: Suppurative sialadenitis in mandibular gland of a dog - ultrasonographic aspect; Complicações pós-cirúrgicas após a excisão de carcinoma de células escamosas na região perianal em fêmea equina; Parasitism by *dioctophyme renale* (goetze, 1782) in maned wolf (*chrysocyon brachyurus*), Brazil; e Apresentação atípica de tumor venéreo transmissível cutâneo em um cão. Três comunicações curtas: Candida parapsilosis as vero cell culture contaminant in neospora caninum antigen production; Ausência de bacteriófagos líticos para salmonella enteritidis em amostras de ambientes avícolas no noroeste do estado de São Paulo; e Importância do exame coprológico no diagnóstico da euritrematose bovina. Sete artigos originais: Aspectos relacionados com a recuperação embrionária em éguas da raça brasileiro de hipismo, utilizadas em programa comercial de transferência de embrião; Validação do método de quimioluminescência para determinação de paratormônio intacto em cães; Suplementação de vacas leiteiras em pastagens de capim xaraés no período das águas; Microbiota bacteriana e fúngica presentes na cloaca de jabutis-piranga (*geochelone carbonaria*) criados em domicílio; Ropivacaína isolada ou associada à morfina, butorfanol ou tramadol pela via peridural em cadelas para realização de ovariosalpingohisterectomia; Avaliação sorológica para *neospora caninum* em propriedades de bovinos leiteiros com alterações reprodutivas; e Aceitabilidade de iogurte de leite de ovelha com adição de alecrim (*rosmarinus officinalis* L.).

**Prof. Helio Langoni**  
Editor-Chefe

## AVALIAÇÃO DOS DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS E DOS DIFERENTES MARCADORES PROGNÓSTICOS CLÍNICO-LABORATORIAIS EM CÃES COM ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNO-MEDIADA

Lívia Fagundes Moraes<sup>1</sup>  
Regina Kiomi Takahira<sup>2</sup>

### RESUMO

A anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) é a causa mais comum dentre as anemias hemolíticas e a doença imuno-mediada de maior prevalência em cães, sendo classificada como primária ou secundária. A AHIM tem sido associada à estados de hipercoagulabilidade e tromboembolismo pulmonar tem sido atribuído como causa mais freqüente de óbito. O prognóstico da AHIM é reservado na maioria dos casos. Alterações laboratoriais incluindo anemia com ausência de regeneração, leucocitose e trombocitopenia intensas, auto-aglutinação, icterícia, hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia, alterações hemostáticas e hemólise intravascular, associados ao tromboembolismo, a principal complicação, acarretam em um prognóstico desfavorável. Cães ictericos apresentando auto-aglutinação são potencialmente candidatos ao desenvolvimento de tromboembolismo, principalmente pulmonar, com maiores chances de óbito. A liberação do estroma das hemácias durante a hemólise pode ser o desencadeador da coagulação intravascular disseminada (CID). A alta freqüência de alterações hemostáticas fundamenta a importância de um diagnóstico precoce, efetivo e mais preciso, além da utilização de estratégias preventivas e quanto ao tratamento das mesmas.

**Palavras-chave:** anemia hemolítica imuno-mediada, cão, hemostasia, prognóstico

### ASSESSMENT OF HEMOSTATIC DISORDERS AND DIFFERENT CLINICAL AND LABORATORY PROGNOSTIC MARKERS IN DOGS WITH IMMUNE-MEDIATED HEMOLYTIC ANEMIA

#### ABSTRACT

Immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) is the most common cause of hemolytic anemia and the most prevalent immune-mediated disease in dogs, which is classified in primary or secondary. IMHA has been associated with hypercoagulability state and pulmonary thromboembolism has been referred as the most frequent cause of death. The prognosis of IMHA is reserved in most cases. Laboratory abnormalities including non regenerative anemia, marked thrombocytopenia and leukocytosis, auto-agglutination, icterus, hyperbilirrubinemia, hypoalbuminemia, hemostatic abnormalities and intravascular hemolysis, associated with thromboembolism, the major complication, leads a poor prognosis. Icteric dogs presenting auto-agglutination are prone to develop thromboembolism, especially pulmonary, with higher risk of death. The erythrocytes stroma release due to hemolysis may be the trigger of disseminated intravascular coagulation (DIC). The high frequency of hemostatic

<sup>1</sup> \* Autor para correspondência. Mestranda do Laboratório Clínico - Depto de Clínica Veterinária. Distrito de Rubião Jr s/n Botucatu SP Cep: 18618-070 Cx postal: 560 FMVZ Unesp Botucatu. Tel: 14-38116115/ 81116413 Fax: 14-38116067. E-mail: liviafm@gmail.com

<sup>2</sup> Professora Adj Laboratório Clínico – Depto Clínica Veterinária Distrito de Rubião Jr s/n Botucatu SP Cep: 18618-070 Cx postal: 560 FMVZ Unesp Botucatu

abnormalities supports the importance of an early, effective and more accurate diagnosis, along with a preventive strategy and treatment.

**Keywords:** immune-mediated hemolytic anemia, dog, hemostasia, prognostic.

## EVALUACIÓN DE LOS DISTURBIOS HEMOSTÁTICOS Y DE LOS DIFERENTES MARCADORES DE LABORATORIO CLÍNICO EN PERROS CON ANEMIA HEMOLÍTICA INMUNOMEDIADA

### RESUMEN

La anemia hemolítica inmunomediada (AHIM) es la más común entre las anemias hemolíticas y la principal afección inmunomediada en perros, siendo clasificada como primaria o secundaria. La AHIM ha sido asociada a estados de hipercoagulación y tromboembolia pulmonar, las cuales fueron indicadas como las causas más comunes de muerte. El pronóstico de la AHIM es reservado en la mayoría de los casos. Las alteraciones en los análisis clínicos tales como anemia no regenerativa, leucocitosis y trombocitopenia intensa, autoaglutinación, ictericia, hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia, alteraciones hemostáticas y hemólisis intravascular, asociados a tromboembolia como complicación principal, llevan a un pronóstico desfavorable. Perros ictericos que presentan autoaglutinación son candidatos potenciales a sufrir tromboembolia, principalmente pulmonar, lo que aumenta el riesgo de muerte. La liberación del estroma de los eritrocitos durante la hemólisis puede desencadenar coagulación intravascular diseminada (CID). La alta frecuencia de alteraciones hemostáticas fundamenta la importancia de un diagnóstico precoz, efectivo y preciso, además de estrategias para la prevención y tratamiento de dicho disturbio.

**Palabras claves:** anemia hemolítica imuno-mediada, perros, hemostasia, pronóstico.

### INTRODUÇÃO

Distúrbios imunológicos são mais comumente diagnosticados em cães do que em outras espécies, sendo as doenças imuno-mediadas de natureza hematológica as mais comuns (1-3). A anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) é a causa mais comum dentre as anemias hemolíticas e a doença imuno-mediada de maior prevalência em cães (4-7). A AHIM é caracterizada pela destruição direta ou fagocitose de hemácias opsonizadas por imunoglobulinas como IgG ou IgM e/ou complemento. Os anticorpos podem ser direcionados às hemácias normais (AHIM primária ou idiopática) ou, ainda, às hemácias antigenicamente alteradas pela ação de drogas, neoplasias ou doenças infecciosas (leptospirose, babesiose, erliquiose canina), sendo esta última conhecida como AHIM secundária (4, 6, 8).

Há uma discordância em relação à prevalência das AHIM primária e secundária em cães. Estes resultados podem ser decorrentes de uma maior prevalência real da AHIM secundária ou, então, da realização de uma investigação diagnóstica mais detalhada em busca da causa base para a anemia em questão, pois o diagnóstico de AHIM primária é feito por exclusão (3, 9, 10).

Duval e Giger (11) sugerem uma associação entre a vacinação e o desenvolvimento da AHIM, pois cerca de um quarto dos animais (26%) com AHIM de causa desconhecida possuía um histórico de vacinação (vacina polivalente) de até quatro semanas antes do início dos sintomas.

Poucos relatos correlacionam a AHIM secundária com a picada de abelhas em cães (12). As complicações clínicas resultantes das picadas de abelhas estão diretamente relacionadas ao número e local das picadas e fatores como idade, estado de saúde,

hipersensibilidade e espécie envolvida (13). Os casos mais graves podem apresentar-se laboratorialmente compatíveis com AHIM, incluindo hemólise intravascular, esferocitose, anemia arregenerativa, icterícia, hemoglobinúria e hematúria (12, 14).

A predisposição genética é evidente em alguns cães devido à grande incidência e a ocorrência familiar em algumas raças. O Cocker Spaniel representa cerca de um terço dos casos de AHIM idiopática, mas raças como o Old English Sheepdog, Doberman, Pinscher miniatura, Collie e Setter Irlandês apresentam uma elevada incidência da doença. Fêmeas inteiras adultas-jovens apresentam uma maior predisposição à doença (6, 15, 16). Além dos fatores racial e sexual, o tipo sanguíneo também está associado ao desenvolvimento da AHIM, pois cães da raça Cocker Spaniel DEA positivos têm um menor risco de desenvolvê-la (16).

Aproximadamente 50% dos cães com AHIM apresentam estado de hipercoagulabilidade no momento do diagnóstico (9). O tromboembolismo pulmonar tem sido atribuído como causa mais frequente de óbito em cães com AHIM, sendo encontrado em 80% dos casos em avaliação de necropsia (17). Um estudo recente encontrou evidências de tromboembolismo em todas as necropsias realizadas (18).

Este trabalho tem como objetivo destacar a importância das alterações tromboembólicas nos casos de AHIM e a determinação dos fatores de risco para o desenvolvimento destas complicações, somados aos fatores prognósticos clínico-laboratoriais associados à doença.

## ASPECTOS GERAIS

As causas da AHIM primária ou idiopática não estão totalmente esclarecidas, mas têm sido associadas à formação de auto-anticorpos contra glicoforinas, espectrina (proteína do citoesqueleto) e proteína de membrana de troca iônica de hemácias (15). Na maioria dos casos de AHIM, os auto-antígenos correspondem a glicoforina da membrana do eritrócito canino, sendo este o maior alvo para os auto-anticorpos (19, 20).

Processos inflamatórios ou infecciosos podem liberar novos antígenos na circulação, que acarretam em reações cruzadas com antígenos eritrocitários, ou que se aderem à membrana dos eritrócitos. Alguns antígenos eritrocitários estão ocultos e somente são expostos após a lesão da membrana celular (7).

As AHIM podem ser classificadas em regenerativas ou arregenerativas e em intra ou extravasculares, de acordo com o tipo de resposta medular e destruição celular envolvidas, respectivamente (21). A reação imune da AHIM é definida como hipersensibilidade do tipo II por ser mediada por complemento e anticorpos das classes IgG e IgM, sendo o envolvimento de IgG mais comum. A lise celular está relacionada com o tipo e quantidade de anticorpos ligados à membrana dos eritrócitos e o envolvimento ou não do complemento (4, 22, 23).

Geralmente, o processo de destruição celular é extravascular, dependente do reconhecimento da ligação das imunoglobulinas e/ou complemento na superfície dos eritrócitos pelos macrófagos, principalmente esplênicos e hepáticos. Eritrócitos revestidos por IgG podem ser destruídos sem ativação do complemento, pois há uma interação com a porção Fc de IgG e o receptor expresso em macrófagos para esta porção. Somada à ligação com IgG, a presença de complemento aumenta o processo de fagocitose, principalmente por macrófagos hepáticos que possuem receptores para o complemento (7, 22). Os macrófagos não possuem receptores para porção Fc de IgM, portanto, a destruição de eritrócitos ligados a IgM é mediada por complemento. A estrutura pentamérica desta molécula é capaz de se ligar e ativar a via clássica do complemento nos eritrócitos gerando uma hemólise intravascular. Entretanto, a IgM normalmente está presente em quantidades inferiores às ideais para promover a lise celular (7, 21).

Além do envolvimento de IgG e IgM e/ou complemento, a classificação da AHIM ainda pode levar em consideração a temperatura ótima de reação do anticorpo e a natureza do

processo hemolítico (predomínio de IgG ou IgM, remoção esplênica ou hepática das hemácias, capacidade de aglutinação ou hemólise e alteração clínica) (15, 22). Anticorpos anti-eritrocitários que induzem hemólise geralmente são ativos à temperatura corpórea (7).

A hemostasia é um equilíbrio delicado entre a coagulação e fibrinólise, necessitando funcionar de acordo com seus componentes adequadamente regulados para a ativação e a formação de seus produtos. Para isso, diversos inibidores são produzidos para que não ocorra um descontrole, gerando um problema hemorrágico ou a formação de trombos (24).

Os distúrbios hemostáticos observados em animais podem ser ocasionados por trombocitopenia (destruição imunomediada, hipoplasia medular, consumo excessivo ou seqüestro), vasculite, defeitos funcionais plaquetários, coagulopatias congênicas (deficiência do fator VIII - hemofilia A ou do fator IX - hemofilia B) ou adquiridas (hepatopatias, antagonismo de vitamina K), acidente ofídico, CID, doença de Von Willebrand, trombose, entre outros (25).

Apesar da frequência com que ocorrem os distúrbios hemostáticos em cães com AHIM e do fato de os eventos tromboembólicos serem frequentes causas de letalidade, o mecanismo para esta condição é desconhecido. Algumas hipóteses são levantadas para este estado de hipercoagulabilidade como o aumento da concentração de fatores pró-coagulantes, a diminuição da concentração de fatores anticoagulantes e fibrinolíticos, a presença de coagulação intravascular disseminada, aumento da atividade plaquetária e a presença de anticorpos anti-fosfolipídeos (9, 10, 18).

#### **Alterações clínico-laboratoriais**

Os sinais clínicos mais comuns da AHIM estão associados à anemia, como fraqueza, letargia, intolerância ao exercício e palidez de mucosas. Os sinais podem ser agudos ou crônicos e incluem também anorexia, vômito, diarreia, pirexia, icterícia, desconforto abdominal, taquicardia, dispnéia, alteração na coloração da urina, esplenomegalia e menos comumente, hepato e linfadenomegalia (2, 6, 26).

As alterações laboratoriais incluem intensa anemia regenerativa, macrocítica, hipocrômica, presença de esferócitos e reticulocitose. Caso a doença apresente um curso agudo sem tempo suficiente para se gerar uma resposta adequada, em um primeiro momento, a anemia será caracterizada como arregenerativa. No entanto, em cerca de um terço dos casos, os anticorpos podem ser direcionados contra precursores medulares eritróides ou a AHIM pode acarretar em alterações no microambiente medular e prejudicar a eritropoiese, levando a uma anemia arregenerativa de fato (7, 8, 27).

A leucocitose é caracterizada por uma neutrofilia discreta a intensa com alterações tóxicas e desvio à esquerda, sendo este degenerativo em alguns casos. A presença de lesões teciduais (necrose), provavelmente decorrentes de hipóxia ou doença tromboembólica, é o primeiro estímulo para a leucocitose em casos de AHIM em cães. A combinação de diversos outros mecanismos pode resultar em leucocitose nos casos de AHIM, como a presença de citocinas que estimulam uma hiperplasia mielóide, somadas a uma maior liberação medular, demarginação de neutrófilos e diminuição da migração destas células para tecidos com baixa perfusão e com lesões necróticas (28).

O perfil bioquímico pode revelar a gravidade da lesão tecidual causada pela hipóxia ou pela deposição de imuno-complexos (3). A hipóxia e a nefrotoxicidade causadas pela hemoglobinemia refletem em aumento das enzimas hepáticas e azotemia, respectivamente (6).

Em medicina veterinária, as alterações hemostáticas mais comuns estão relacionadas ao aumento da tendência ao sangramento, geralmente causadas por redução da atividade de fatores de coagulação ou redução numérica ou funcional das plaquetas (26). Apesar da frequência com que ocorrem os distúrbios hemostáticos em cães com AHIM e do fato de os eventos tromboembólicos serem frequentes causas de letalidade, o mecanismo para esta condição é desconhecido. Algumas hipóteses são levantadas para este estado de

hipercoagulabilidade como o aumento da concentração de fatores pró-coagulantes, a diminuição da concentração de fatores anticoagulantes e fibrinolíticos, a presença de coagulação intravascular disseminada (CID), aumento da atividade plaquetária e a presença de anticorpos anti-fosfolipídeos (9, 10, 18).

A trombocitopenia é um achado laboratorial comum nas AHIM, incluindo a vasculite e a destruição imuno-mediada, além do consumo na CID como as causas desta alteração. Cerca de 10% dos animais apresentam AHIM associada à trombocitopenia imuno-mediada (Síndrome de Evans) (9). Outras alterações hemostáticas associadas à AHIM incluem diminuição da concentração do fibrinogênio e antitrombina (AT), prolongamento do tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), tempo de coagulação (TC) e tempo de trombina (TT) e aumento dos produtos da degradação da fibrina (PDF) e Dímeros-D. Em alguns casos de CID podem ser observados esquizócitos. A causa mais comum de diminuição de antitrombina nos casos de AHIM está relacionada ao consumo na CID (9, 29).

Cães com AHIM possuem valores médios de TTPA e TT significativamente diferentes em relação a cães saudáveis, mas sem alterações significativas para TP. Três cães apresentaram prolongamento do TP, 15 do TTPA, 15 apresentaram encurtamento do TT e 17 trombocitopenia. Todos os animais apresentaram aumento nos níveis de produtos de degradação da fibrina (PDFs), sendo que 30% dos cães apresentaram concentrações de Dímero-D aumentadas. Os cães com AHIM apresentaram valores médios de VCM, metarrubricitos e contagem de reticulócitos significativamente maiores que os dos animais anêmicos negativos para AHIM. 20% dos cães com AHIM apresentaram esferocitose e 30% leucocitose. 90% dos casos de AHIM foram secundários a doenças infecciosas, em sua maioria associadas à *Ehrlichia canis* (65%) pela técnica de PCR (30).

### **Fatores prognósticos**

Atualmente, diversos estudos têm sido propostos na tentativa de se determinar fatores prognósticos, de natureza clínica ou laboratorial para os casos de AHIM. Entretanto, ainda não há um consenso a respeito desses fatores.

O prognóstico da AHIM é reservado na maioria dos casos. Alterações laboratoriais incluindo anemia com ausência de regeneração, leucocitose e trombocitopenia intensas, auto-aglutinação, icterícia, hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia, alterações hemostáticas e hemólise intravascular, associados ao tromboembolismo, a principal complicação, acarretam em um prognóstico desfavorável (17, 18, 27).

Cães ictericos apresentando auto-aglutinação são potencialmente candidatos ao desenvolvimento de tromboembolismo, principalmente pulmonar, com maiores chances de óbito se comparados com animais que não as manifestam (2, 27, 31). O aumento da mortalidade em casos de hiperbilirrubinemia tem sido atribuído ao alto índice de hemólise intravascular, devido a grande quantidade de IgM e complemento, e conseqüentemente, um aumento da liberação de membranas de hemácias com ação pró-coagulante (17).

A liberação do estroma das hemácias durante a hemólise pode ser o desencadeador da coagulação intravascular disseminada (CID). Fatores teciduais são produzidos e liberados pelos leucócitos quando as hemácias estão sensibilizadas por auto-anticorpos, sendo estes fatores de grande importância na CID. A presença de hemoglobina livre também predispõe a estados de hipercoagulabilidade atribuída à ligação com o óxido nítrico (NO) e ao aumento da agregação plaquetária. O NO é vital para a vasodilatação e atua como um potente inibidor da agregação plaquetária (17, 32).

A diminuição das concentrações de albumina tem sido associada a um grande risco tromboembólico, mas a natureza desta associação ainda é incerta. A hipoalbuminemia pode ser justificada por esta ser uma proteína de fase aguda negativa, além do comprometimento hepático e perda proteica por hemorragia serem comumente associados à AHIM (17, 33).

Cães com AHIM e idade entre cinco a oito anos, apresentando auto-aglutinação e aumento de bilirrubina total (BT) possuem uma sobrevida menor, mas não há relação entre sobrevida e intensidade da anemia, contagem de plaquetas ou leucometria total. No entanto, animais com suspeita de trombocitopenia imuno-mediada (TIM) não foram avaliados (34).

Weinkle et al. (18) não detectaram correlação entre intensidade da anemia, atividade sérica de fosfatase alcalina (FA) ou ausência de resposta regenerativa eritróide com a taxa de mortalidade em cães com AHIM. No entanto, os animais que vieram a óbito apresentaram médias maiores de leucocitose e atividade de creatina quinase (CK) e menores concentrações de albumina e potássio, sendo este último relacionado a complicações tromboembólicas devido à vasoconstrição.

Aproximadamente 65–70% dos cães com AHIM também apresentam trombocitopenia e cerca de 20% dos cães apresentam contagem de plaquetas inferior a 50.000/ $\mu$ L, sendo a trombocitopenia associada ao aumento da mortalidade e risco de trombose (9, 17).

Cães com AHIM e trombocitopenia intensa (<50.000/ $\mu$ L) provavelmente por destruição primária, sem relação com CID ou tromboembolismo, apresentaram uma taxa de mortalidade maior (76,2%) do que animais apenas com AHIM. Destes, alguns possuíam histórico sugestivo ou evidências, atribuídos a defeitos na hemostasia primária (35).

A incidência de CID em pacientes com AHIM está entre 12% a 45% (9, 10, 17, 27). A trombocitopenia intensa está associada ao alto risco de trombose em cães com AHIM, sendo que 90% apresentaram suspeita de CID (17). O diagnóstico confirmatório de CID pode ser difícil nas AHIM, pois grande parte destas alterações hemostáticas também são observadas nos animais apenas com tromboembolismo pulmonar (10). No entanto, o diagnóstico de CID pode não ser um fator de risco para trombose ou mortalidade em pacientes com AHIM (17).

A diminuição da atividade de antitrombina (AAT) tem sido relacionada ao risco tromboembólico e prognóstico desfavorável. Esta diminuição está relacionada com um aumento do consumo, diminuição da produção ou perda (renal, gastrointestinal ou sangramentos). Para cães, acredita-se que há um risco iminente quando a AAT é <30% e um risco elevado com AAT <60%. Ao se comparar animais doentes com AAT normal e diminuída, o segundo grupo apresentou uma menor contagem plaquetária, uma leucocitose mais intensa, assim como um maior prolongamento de TTPA e maior proporção de trombocitopenia e prolongamento de TP. Nos casos de AHIM, a diminuição da AAT ocorre pelo aumento no consumo nos estados de hipercoagulabilidade (36). Além disso, a hipoantitrombinemia é descrita como um marcador prognóstico negativo para AHIM, diferentemente das observações de Scott-Moncrieff et al. (9) que afirmam não haver diferença entre a sobrevida e eventos tromboembólicos dos cães com AHIM quando comparados com animais com AAT normal (36).

Cães com AHIM primária apresentam uma mortalidade significativamente maior quando associada a trombocitopenia, linfopenia, prolongamento de TP e TTPA, hipofibrinogenemia, CID e aumento de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no momento do diagnóstico, assim como uma diminuição da hemoglobina e aumento da leucometria global, bilirrubina e ureia plasmáticas entre o momento do diagnóstico e após três dias de evolução, sendo esses parâmetros laboratoriais úteis no prognóstico das AHIM (37).

Um sistema de escore, baseado em alterações clínicas tidas como indicadores de prognóstico (idade, temperatura corporal, presença de auto-aglutinação e concentrações de bilirrubina e albumina) foi proposto para se determinar o prognóstico de cães com AHIM. Cães que sobreviveram à doença apresentaram um escore menor do que cães que vieram a óbito ou foram eutanasiados. Este sistema tem como objetivo auxiliar na determinação do prognóstico e instituir uma possível base comparativa dos diferentes tratamentos utilizados para cães com sinais clínicos semelhantes (38).

Um segundo sistema de escore avalia os seguintes parâmetros: sexo, sazonalidade (estações quentes e frias), hematócrito ( $<$  ou  $\geq$  a 20%), contagem de plaquetas ( $<$  ou  $\geq$  a 200.000/ $\mu$ L) e proteína total (PT) ( $<$  ou  $\geq$  a 6,0g/dL). Cada escore é somado e os cães classificados em cinco grupos (escore 0 a 5). Cães com escore 0 a 1 apresentam melhor prognóstico, pois nenhum animal veio a óbito. Cães com escore 2 ou 3 apresentaram um prognóstico intermediário e com escore 4 e 5 um prognóstico desfavorável (39).

Considerando-se outros fatores prognósticos, observou-se uma influência significativa para sexo, peso corporal, sazonalidade, hematócrito, contagem de plaquetas, PT, uréia nitrogenada, albumina, BT, sódio, TP e PDF, antes do tratamento com imunossupressão, quando comparados os animais sobreviventes com os que vieram a óbito. Cães machos, acima de 12kg, nas estações mais quentes do ano, com intensa anemia (hematócrito inferior a 20%) e aumento de uréia nitrogenada de origem pré-renal, de PDF, TP e BT, somados a diminuição de sódio, plaquetas, albumina e PT apresentaram um prognóstico mais desfavorável (39).

A proporção entre síntese e liberação de algumas proteínas plasmáticas, como a haptoglobina, ceruloplasmina (Cp) e proteína C reativa (PCR), aumenta em processos inflamatórios (proteínas de fase aguda positiva). Esta resposta é rápida e anterior à resposta imune específica, ou mesmo anterior aos sinais clínicos e de outras alterações inflamatórias tradicionais como leucocitose e neutrofilia. Cães com AHIM apresentaram um aumento em todas as proteínas de fase aguda, sendo que apenas o aumento de Cp e PCR foram significativos quando comparado com animais saudáveis (40). Um rápido decréscimo da concentração de PCR é observado nos primeiros dias pós-tratamento, retornando ao intervalo de referência em sete a nove dias com o sucesso do mesmo. Há uma correlação significativa entre PCR e contagem de leucócitos e hematócrito, sendo que estes dois últimos parâmetros retornam ao intervalo de referência em cerca de 30 e 90 dias, respectivamente. Portanto, as determinações das concentrações destas proteínas são valiosas como rápidos marcadores de remissão da doença e eficácia terapêutica (33, 41).

No Brasil, não há um estudo que determine os fatores prognósticos das AHIM. A presença de áreas endêmicas para diversas doenças infecciosas pode contribuir para a maior prevalência de AHIM secundária e ao maior risco tromboembólico e mortalidade associados a esta doença, ou ainda, diferentes parâmetros determinantes para o prognóstico, uma vez que os estudos internacionais avaliam principalmente a AHIM primária.

## COMENTÁRIOS FINAIS

A alta frequência de alterações hemostáticas juntamente com as alterações tromboembólicas fundamentam a importância de um diagnóstico precoce, efetivo e mais preciso, além da utilização de estratégias preventivas no que se refere à determinação dos fatores de risco para o desenvolvimento destas complicações e ao tratamento das mesmas nas AHIM. Dessa forma, ressalta-se a necessidade de estudos, pois são poucos os dados disponíveis sobre os fatores que determinam a ocorrência das alterações hemostáticas nas AHIM.

Assim, o risco de CID e de eventos tromboembólicos devem ser considerados para uma investigação clínico-laboratorial mais criteriosa, como fatores prognósticos e na conduta terapêutica dos casos de AHIM. Além disso, há a necessidade de se avaliar o quanto a ocorrência de uma doença primária pode contribuir para um maior risco de eventos tromboembólicos.

A determinação dos fatores prognósticos pode direcionar de forma mais efetiva a terapêutica diante das diversas variáveis clínico-laboratoriais encontradas nas AHIM. As diferenças entre países observadas na identificação dos fatores prognósticos nas AHIM ressaltam a importância de uma investigação epidemiológica para se definir a prevalência de AHIM primária ou secundária e as alterações clínicas e laboratoriais associadas.

**REFERÊNCIAS**

1. Penhale WJ, Day MJ, Lines AD, Mckenna RP. A review of cases submitted to Murdoch University for immunodiagnostic testing: 1978- 1989. *Aust Vet J.* 1990;67(4):148-9.
2. Nelson RW, Couto CG. *Small animal internal medicine.* 4ª ed. St. Louis, Missouri: Mosby; 2009.
3. Pereira PM. Avaliação de métodos diagnósticos (citometria de fluxo, teste da antiglobulina direta, auto-aglutinação, presença de esferócitos) e achados clínico-laboratoriais na anemia hemolítica imuno-mediada em cães [tese]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista; 2006.
4. Mackin A. Immune-mediated haemolytic anaemia. In: Day MJ, Mackin A, Littlewood JD. *Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine.* Gloucester: BSAVA; 2000. p.67-77.
5. Quigley KA, Chelack BJ, Haines DM, Jackson ML. Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. *J Vet Diagn Invest.* 2001;13(4):297-300.
6. Mccullough S. Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003;33(6):1295-315.
7. Giger U. Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis. In: Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of veterinary internal medicine.* 6ª ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; 2005. p.1886-907.
8. Honeckman AL, Knapp DW, Reagan WJ. Diagnosis of canine immune-mediated hematologic disease. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1996;18(2):113-24.
9. Scott-Moncrieff JC, Treadwell NG, Mccullough SM, Brooks MB. Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2001;37(3):220-7.
10. Balch A, Mackin A. Canine immune-mediated hemolytic anemia: treatment and prognosis. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 2007;29(4):230-8.
11. Duval D, Giger U. Vaccine-associated immune-mediated hemolytic anemia in the dog. *J Vet Intern Med.* 1996;10(5):290-5.
12. Noble SJ, Armstrong J. Bee sting envenomation resulting in secondary immune-mediated hemolytic anemia in two dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1999;214(7):1026-7.
13. Rodrigues-Lainz A, Fritz CL, Mckenna WR. Animal and human health risks associated with Africanized honeybees. *J Am Vet Med Assoc.* 1999;215(12):1799-804.
14. Wysoke JM, Berg PBV, Marshall C. Bee sting-induced haemolysis, spherocytosis and neural dysfunction in three dogs. *J S Afr Vet Assoc.* 1990;61(1):29-32.
15. Tizard IR. *Veterinary immunology - an introduction.* 7ª ed. Philadelphia: WB Saunders; 2004.

16. Miller SA, Hohenhaus AE, Hale AS. Case-control study of blood type, breed, sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *J Am Vet Med Assoc.* 2004;224(2):232-5.
17. Carr AP, Panciera DL, Kidd L. Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. *J Vet Intern Med.* 2002;16(5):504-9.
18. Weinkle TK, Center SA, Randolph JF, Warner KL, Barr SC, Erb HN. Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). *J Am Vet Med Assoc.* 2005;226(11):1869-80.
19. Barker RN, Gruffdy-Jones TJ, Stokes CR, Elson CJ. Identification of autoantigens in canine autoimmune haemolytic anaemia. *Clin Exp Immunol.* 1991;85(1):33-40.
20. Barker RN, Elson CJ. Red blood cell glycoporphins as B and T-cell antigens in canine autoimmune haemolytic anaemia. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;47(3-4):225-38.
21. Balch A, Mackin A. Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 2007;29(4):217-25.
22. Stewart AF, Feldman BF. Immune-mediated hemolytic anemia. Part I. An overview. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1993;15(3):372-81.
23. Wilkerson MJ, Davis E, Shuman W, Harkin K, Cox J, Rush B. Isotype-specific antibodies in horses and dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *J Vet Intern Med.* 2000;14:190-6.
24. Colman RW, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, Marder VJ. Overview of hemostasis. In: *Hemostasis and thrombosis basic principles and clinical practice.* 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p.3-15.
25. Takahira RK. Hemostáticos, anticoagulantes e antianêmicos. In: *Andrade SF. Manual de terapêutica veterinária.* 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca; 2008. p.748-57.
26. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's veterinary hematology.* 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
27. Klag AR, Giger U, Shofer FS. Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 42 cases (1986- 1990). *J Am Vet Med Assoc.* 1993;202(5):783-8.
28. Mcmanus PM, Craig LE. Correlation between leucocytosis and necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34 cases (1994- 1999). *J Am Vet Med Assoc.* 2001;218(8):1308-13.
29. Feldman BF, Madewell BR, O'Neill S. Disseminated intravascular coagulation: Antithrombin, plasminogen and coagulation abnormalities in 41 dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1999;179(2):151-4.
30. Moraes LF, Takahira RK, Thomazini CM, Golim MA. Evaluation of thromboembolic risk and hematologic profile in dogs with IMHA. In: *Annual Meeting of the 45th American Society for Veterinary Clinical Pathology; 2010, Baltimore.* Baltimore, Maryland: ASVCP; 2010. p.563-4.

31. Johnson LR, Lappin MR, Baker DC. Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995. *J Vet Intern Med.* 1999;13(4):338-45.
32. Cappellini MD. Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007;1:74-8.
33. Mitchell KD, Kruth SA, Wood RD, Jefferson B. Serum acute phase protein concentrations in dogs with autoimmune hemolytic anemia. *J Vet Intern Med.* 2009;23(3):585-91.
34. Mcalees TJ. Immune-mediated haemolytic anaemia in 110 dogs in Victoria, Australia. *Aust Vet J.* 2010;88(1-2):25-8.
35. Goggs R, Boag AK, Chan DL. Concurrent immune-mediated haemolytic anaemia and severe thrombocytopenia in 21 dogs. *Vet Rec.* 2008;163(11):323-7.
36. Kuzi S, Segev G, Haruvi E, Aroch I. Plasma antithrombin activity as a diagnostic and prognostic indicator in dogs: a retrospective study of 149 dogs. *J Vet Intern Med.* 2010;24(3):587-96.
37. Griebisch C, Arndt G, Kohn B. Evaluation of different prognostic markers in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2010;123(3-4):160-8.
38. Whelan MF, Rozanski EA, O'Toole TE, Crawford SL, Holm J, Cotter SM. Use of the canine hemolytic anemia objective score (CHAOS) to predict survival in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. In: *Research Abstract Program of the 24th Annual ACVIM Forum; Louisville. Louisville – KY: ACVIM; 2006. p.714-5.*
39. Ishihara M, Fujino Y, Setoguchi A, Takahashi M, Nakashima K, Ohno K, et al. Evaluation of prognostic factors and establishment of a prognostic scoring system for canine primary immune-mediated hemolytic anemia. *J Vet Med Sci.* 2010;72(4):465-70.
40. Tecles F, Spiranelli E, Bonfanti U, Ceron JJ, Paltrinieri S. Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *J Vet Intern Med.* 2005;19(6):865-70.
41. Griebisch C, Arndt G, Raila J, Schweigert FJ, Kohn B. C-reactive protein concentration in dogs with primary immunemediated hemolytic anemia. *Vet Clin Pathol.* 2009;38(4):421-5.

**Recebido em: 29/08/11**

**Aceito em: 19/10/12**

**SUPLEMENTAÇÃO DA AMOREIRA NA ALIMENTAÇÃO DO *Bombyx mori* L.**Antonio José Porto<sup>1</sup>**RESUMO**

O desempenho na criação comercial do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) depende, em grande parte, da qualidade da folha de amoreira fornecida. Embora existam dietas artificiais especificamente formuladas, a folha ainda é a fonte alimentar mais barata e utilizada na maioria dos países produtores. Assim, esforços têm sido conduzidos no sentido de produzir e disponibilizar material de alto valor nutricional, que atenda as necessidades biológicas e produtivas do inseto. O levantamento e apresentação das principais técnicas, estratégias e substâncias, que aplicadas direta ou indiretamente na amoreira, promovam a suplementação alimentar no bicho-da-seda é o propósito desta revisão, assim como sugerir e discutir novas possibilidades, dando ao produtor alternativas para um manejo nutricional mais dinâmico e racional.

**Palavras-chave:** bicho-da-seda, folha da amoreira, nutrição.

**SUPPLEMENTATION OF MULBERRY IN FEEDING OF *Bombyx mori* L.****ABSTRACT**

The performance in the commercial breeding of silkworm (*Bombyx mori* L.) depend largely on the quality of the leaf provided. Although there are artificial diets specifically formulated, the mulberry leaf is still the cheapest source of food and used in most producing countries. Thus, efforts have been conducted to produce and make available material of high nutritional value, which meets the biological and productive needs of the insect. The lifting and presentation of the main techniques, strategies and substances that directly or indirectly applied in the mulberry, promote food supplementation in silkworm is the purpose of this review, as well as suggest and discuss new possibilities, giving the producer an alternative to nutritional management more dynamic and rational.

**Keywords:** silkworm, mulberry leave, nutrition.

**COMPLEMENTACIÓN CON MORERA PARA LA ALIMENTACIÓN DE *Bombyx mori* L.****RESUMEN**

El desempeño en la crianza comercial del gusano de seda (*Bombyx mori* L.) depende en gran medida de la calidad de la hoja de morera proporcionada. A pesar de de la existencia de dietas artificiales especificamente formuladas, la hoja de morera sigue siendo la fuente de alimento más barata y utilizada en la mayoría de los países productores. Por lo tanto, se han llevado a cabo programas para producir y poner a disposición material con alto valor nutricional, que satisfaga las necesidades biológicas y productivas de estos insectos. La recopilación y

---

<sup>1</sup> Pesquisador Científico. Rodovia Eduardo Dias de Castro, Km 1,5 – CP. 16 CEP. 17450 000 - Gália, SP, Brasil. Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Gália. Pólo Regional Centro Oeste, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (UPD/APTA/SAA). Tel./Fax: 0XX(14) 3274 1140, E-mail: porto@apta.sp.gov.br

presentación de las principales técnicas, estrategias y sustancias que directa o indirectamente aplicado a la morera, promueven la complementación alimenticia del gusano de seda es el propósito de esta revisión, así como sugerir y discutir nuevas posibilidades, dando alternativas al productor para un manejo nutricional más dinámico y racional.

**Palabras claves:** gusano de seda, hoja de morera, nutrición.

## INTRODUÇÃO

O bicho-da-seda, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), em sua evolução desenvolveu alta afinidade nutricional com uma espécie vegetal específica, a amoreira (*Morus* sp.), podendo ser classificado, conforme o hábito alimentar, em monófago (um tipo de alimento), fitófago (origem vegetal) e filófago (folhas) (1). As interações entre insetos e plantas hospedeiras são determinadas por estímulos, relacionados com a presença de substâncias primárias (estímulo nutritivo) e secundárias (estímulo de odor, sabor) nas plantas (2).

No caso do bicho-da-seda, as lagartas são inicialmente atraídas por odores das folhas da amoreira (fatores de atração, ex.: citral). Quando ocorre o contato, a presença de algumas substâncias estimula a maxila do inseto, desencadeando o comportamento da mordida (fator de mordida, ex.:  $\beta$ -sitosterol, morin ou isoquercitrin). Dentro do aparelho bucal, outro agente estimula o processo de contínua deglutição (fator de deglutição, ex.: pó de celulose). Além desses, ocorre ação de outras substâncias, denominadas de fatores suplementares (ex.: difosfato de potássio, sucrose, inositol, silicasol). O conjunto dos fatores induz a alimentação do inseto (3).

Apenas em condições extremas, como no Japão, onde as adversidades do clima e os altos custos restringem a produção da amoreira, a substituição da folha por dietas artificiais tornou-se uma necessidade (3, 4). Na maioria dos países produtores de seda, localizados em regiões tropicais, a folha da amoreira ainda é o único alimento das lagartas, sendo utilizada na sua forma natural.

A estreita relação de dependência do bicho-da-seda com a amoreira simplifica o manejo alimentar, quando se considera a produção de um único tipo de alimento, as facilidades de implantação, formação e manutenção do amoreiral, entre outros fatores. Por outro lado, a necessidade de um alimento sempre fresco coloca o inseto em condição vulnerável frente às variações que afetam a qualidade da folha. Assim, mesmo apresentando características que normalmente atendem as necessidades básicas, a amoreira está sujeita a significativas alterações em sua composição, relacionadas com a cultivar utilizada, com condições climáticas, espaçamento, disponibilidade de água, tipos de solo, podas, crescimento e maturidade das folhas, transporte e armazenamento das folhas, entre outros (5). Além das exigências intrínsecas à espécie, deve-se levar em conta que, em criações comerciais, utilizam-se lagartas híbridas de alto desempenho produtivo, com conseqüente aumento das exigências nutricionais.

Frente a essas condições, torna-se imprescindível a produção e disponibilização de material alimentar de alto valor nutricional. Nesse sentido, estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de avaliar substâncias que, aplicadas de forma direta ou indireta na amoreira, supram as deficiências ou elevem os componentes nutricionais da folha, promovendo efeitos benéficos para o inseto e conseqüentemente na produção de seda. O levantamento e apresentação das principais técnicas, estratégias e substâncias utilizadas para suplementação alimentar do bicho-da-seda é o propósito deste trabalho, assim como sugerir e discutir novas possibilidades.

## Técnicas e estratégias para suplementação alimentar do bicho-da-seda

### 1. Adubação

O uso de fertilizantes é uma das mais antigas e preconizadas práticas para melhorar a produção da amoreira, em quantidade e qualidade. De acordo com Abramides (6), o principal fator de recuperação do amoreiral é a adubação, provendo-o de condições para aumentar a produção de massa foliar, assim como elevar o teor de nutrientes das folhas e conseqüentemente melhorar a produção de casulos. A adubação pode ser realizada no solo ou diretamente nas folhas.

#### a) Solo

A aplicação de adubos orgânicos e químicos na cultura da amoreira é descrita nos manuais de Sericicultura, sendo comumente recomendada em função dos resultados de análises e exigências nutricionais da planta. Efeitos da adubação na amoreira sobre o desempenho do bicho-da-seda têm sido amplamente investigados.

Dentre os fertilizantes mais estudados estão os nitrogenados. Lagartas do bicho-da-seda alimentadas com folhas de amoreira obtidas de plantas que receberam 200 Kg de nitrogênio/ha/ano apresentaram aumento significativo no peso larval, peso do casulo, peso da casca sérica e comprimento do fio de seda (7). A incorporação de nitrogênio no amoreiral e sua influência no desempenho do bicho-da-seda foi avaliado por Sudo, Sho e Okajima (8). Os autores concluíram que houve correlação positiva entre os níveis de adubação e os teores de nitrogênio nas folhas e alta correlação entre o nitrogênio das folhas e características como peso das lagartas, peso dos casulos e quantidade de seda. Purohit e Kumar (5) relataram, no entanto, que mesmo havendo tendência de que o aumento no teor de proteína na folha de amoreira eleve a produção de casulo em cerca de 6% para cada adicional de 100 Kg de nitrogênio/ha/ano, não existem efeitos pronunciados do nível de nitrogênio acima de 300 Kg/ha/ano sobre as características do casulo.

Casulos mais pesados foram obtidos de lagartas do bicho-da-seda alimentadas com folhas de amoreira provenientes de plantas adubadas com 200 gramas de sulfato de amônio/planta, quando parcelado em três vezes ao invés de dose única (9).

Além dos adubos nitrogenados, outros tipos são analisados e comparados entre si, quanto aos efeitos na produção da amoreira e características do *Bombyx mori* L. Takahashi (10) obteve casulos mais pesados para lagartas do bicho-da-seda que receberam folhas de amoreira provenientes de plantas fertilizadas com adubo orgânico (2 Kg de esterco de galinha/planta) em relação aos tratamentos com adubo químico (20 g de N, 10 g de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 15g de K<sub>2</sub>O/planta) e sem adubação. No entanto, para peso das glândulas sericígenas (7º dia do 5º ínstar) não observou variação significativa entre os dois tipos de adubação. Munhoz et al. (11) também analisaram a influência da adubação química (NPK: 20:05:20) e orgânica (esterco de galinha) sobre a produção da amoreira e caracteres biológicos e produtivos do bicho-da-seda. Os autores observaram aumento significativo na produção de biomassa das folhas de amoreira com uso de adubo orgânico, no entanto quanto ao desempenho do bicho-da-seda, poucas variações foram obtidas frente aos tratamentos.

A aplicação de matéria orgânica na amoreira, na forma pura (2 Kg de esterco de galinha/planta) e associado ao gesso agrícola (2 Kg de esterco de galinha + 250 gramas de gesso/planta) foi estudado por Bellizzi, Marchini e Takahashi (12). Pelos resultados apresentados, a cultivar IZ 56/4, adubada com matéria orgânica mais gesso produziu mais folhas e ramos, influenciando positivamente o desempenho do bicho-da-seda quanto ao peso dos casulos e teor de seda.

Combinando N e K na dose de 400 -200 Kg N-K<sub>2</sub>O/ha/ano, aplicado em cinco vezes no amoreiral, Shankar e Rangaswamy (13) obtiveram aumento nos parâmetros de qualidade do bicho-da-seda, como peso do casulo e comprimento do fio de seda.

### **b) Foliar**

A aplicação de nutrientes diretamente nas folhas da amoreira é uma estratégia de adubação considerada muito eficiente como fertilização suplementar (14), podendo ser utilizada em situações específicas, como secas prolongadas e quando se requer uma resposta rápida (15). De acordo com Sihghvi e Bose (16), a resposta das plantas aos nutrientes aplicados na folha é mais rápida, pois esses são facilmente absorvidos pelas folhas e transportados para diferentes partes da planta, ativando reações metabólicas e de assimilação das plantas, contribuindo assim para superar situações de estresse e promover a absorção de nutrientes pela raiz.

Inúmeras fórmulas e compostos vem sendo testados como fertilizante foliar na amoreira. A pulverização foliar com nutrientes primários (N, P e K), secundários (Mg) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn) têm proporcionado bons resultados de produção da amoreira, com ressalva para o potássio, onde injúrias foram observadas nas folhas, sendo recomendado sua aplicação no solo (16).

Aumento na produção total e na composição bioquímica da folha da amoreira também foi observado em plantas pulverizadas com solução de uréia (17). Para Sarker e Absar (14), a suplementação de uréia na folha é mais efetiva que sua aplicação no solo. Esses autores observaram que folhas de amoreira pulverizadas com 0,5 % de uréia mais 2% de solução de FeSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> e MnSO<sub>4</sub> superaram o tratamento controle (pulverização com água) quanto ao conteúdo de nutrientes nas folhas e proporcionaram elevação dos caracteres relacionados ao desempenho do bicho-da-seda como: peso larval, peso de casulo, peso de casca sérica, produção de casulo e comprimento do fio de seda.

## **2. Suplementos foliares**

Neste item será abordada a estratégia de aplicação de substâncias na folha da amoreira, não com o objetivo de elevar a produção de massa foliar, mas melhorar o seu valor nutricional, suplementando a alimentação das lagartas do bicho-da-seda. Benefícios como auxílio no controle de doenças, enriquecimento dos constituintes da folha, crescimento do bicho-da-seda, assim como melhoria de caracteres relacionados com a produção do casulo são associados à aplicação de nutrientes foliares na planta da amoreira (18). Várias substâncias vêm sendo avaliadas como suplemento foliar para o bicho-da-seda, sendo os principais grupos os minerais, vitaminas e proteínas (aminoácidos), além de extratos vegetais e compostos químicos diversos.

### **a) Minerais**

A suplementação mineral do bicho-da-seda traz efeitos no crescimento larval e na qualidade dos casulos (19). De acordo com esses autores, em lagartas do bicho-da-seda alimentadas com folhas de amoreira suplementadas com mistura de biosal (fosfatos de Ca, Mg, K, Fe e soda) foi observado aumento significativo na quantidade de alimento ingerido, assimilado e convertido e na eficiência de conversão.

A alimentação do bicho-da-seda com folhas de amoreira suplementadas com cálcio (1% de cloreto de Ca) e magnésio (1% de cloreto de Mg) resultou em aumento no peso, comprimento e largura do casulo e no peso e porcentagem de casca sérica, quando comparado com o tratamento controle. Valores mais elevados das proteínas da seda (sericina e fibroína) também foram observados com a suplementação de magnésio (20).

Resultados de máximo peso e comprimento corporal em lagartas do bicho-da-seda, assim como superior produção de casulo, foram obtidos nos tratamentos onde os insetos receberam folhas de amoreira mergulhadas em solução de 0,2 % de nitrogênio, 0,3% de potássio, 0,1% de cálcio e 0,05% de cobre (21).

Testando três métodos de administração de minerais na amoreira (solo, injeção na raiz e pulverização foliar), Aslam e Ashfaq (22) concluíram que a pulverização foliar foi o melhor método, pois resultou em valores mais elevados para coeficiente de utilização do alimento pelo bicho-da-seda, para peso e comprimento larval e para peso de casulo, assim como menor porcentagem de mortalidade e menor duração larval.

### **b) Vitaminas**

A suplementação com vitaminas é considerada como forma alternativa para o enriquecimento da folha da amoreira e melhoria na nutrição do bicho-da-seda (23).

Valores superiores para peso de casulo (24) foram obtidos quando lagartas do bicho-da-seda receberam como alimento folhas de amoreira pulverizadas com solução de cloreto de colina (complexo B) a 1%, em relação aquelas que receberam folhas não suplementadas.

Conforme Chandrakala et al. (25), cuidados devem ser tomados nas concentrações de vitaminas utilizadas para suplementação do bicho-da-seda, que são requeridas em micro quantidades, evitando assim os efeitos deletérios.

Babu et al. (26) observaram maiores valores para peso e comprimento do fio de seda quando forneceram suplementação oral de ácido ascórbico (1,5% de ácido ascórbico na folha da amoreira) para lagartas do bicho-da-seda nos primeiros dois ínstares. No entanto há relatos que doses altas de vitamina C causam decréscimo do peso larval, podendo ocasionar a morte das lagartas do *Bombyx mori* L. (27).

A aplicação de determinadas concentrações de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>) na folha da amoreira, como suplemento alimentar para lagartas do bicho-da-seda, resultou em aumento significativo na duração larval, peso do casulo, peso da casca sérica e fecundidade (28).

Entretanto, doses excessivas de vitamina B<sub>3</sub> (concentrações de 1,2 e 3,0 gramas/litro), quando aplicadas na folha da amoreira e fornecidas às lagartas do bicho-da-seda no quarto e quinto ínstar, provocaram a interrupção na alimentação e no crescimento normal das lagartas, sintomas de hipervitaminose, diminuição no peso larval em relação ao grupo controle e aumento do período larval (29).

As vitaminas, aplicadas nas folhas da amoreira como compostos, tem sido objeto de estudos. Resultados positivos no peso da lagarta e do casulo foram obtidos por Evangelista, Carvalho e Takahashi (30), quando suplementaram a folha da amoreira com um complexo multi-vitamínico. Também Etebari e Matindoost (31), quando pulverizaram vitaminas (multi-vitaminas) na folha da amoreira e alimentaram o bicho-da-seda, obtiveram resultados significativamente superiores ao controle para peso larval e peso de casulo.

### **c) Proteínas e aminoácidos**

No bicho-da-seda mais de 60% dos aminoácidos absorvidos são utilizados na produção de seda, sendo que 72 a 86% dos aminoácidos obtidos são provenientes das folhas da amoreira (32), o que exige folhas com alto teor protéico, variando de 15 a 28% (33).

De acordo com Ullal e Narasimhanna (34), ingredientes protéicos de alto valor nutricional e alta digestibilidade, quando fornecidos ao bicho-da-seda como suplementos da dieta, podem melhorar o desenvolvimento larval e a produção de casulos.

A suplementação com éster metil leucina (Leu-OMe) aumentou significativamente a atividade do sistema de transporte digestivo do bicho-da-seda, estimulando a absorção de aminoácidos e conseqüente rapidez no crescimento da lagarta e aumento de 20% no peso da casca sérica (35).

Valores significativamente superiores para peso larval e pupal e para diferentes características do casulo do bicho-da-seda, assim como aumento da fecundidade, fertilidade, emergência de adultos e longevidade, foram obtidos por Laz (36), quando alimentaram lagartas com folhas de amoreira mergulhadas em solução de metionina e triptofano.

O enriquecimento da folha de amoreira com Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS), em quantidade equivalente a 10% da demanda protéica de PB, na dieta a base de folhas da cultivar de amoreira IZ 56/4, proporcionou menor ingestão de alimento pelas lagartas do bicho-da-seda e maior qualidade dos casulos produzidos (37). Também Sedano et al. (38) obtiveram melhores resultados para peso de casulo e teor de seda bruta, quando adicionaram à folha da amoreira EHS e treonina, na quantidade de 10% do total de EHS fornecido na dieta.

Radjabi (39), no entanto, estudando o enriquecimento de folhas de amoreira com diferentes concentrações de aminoácidos (aspergina e alanina), não observaram efeito significativo dos tratamentos sobre a produção de seda.

#### **d) Extratos vegetais**

Vários extratos de plantas têm sido testados como suplementos para o bicho-da-seda, sendo observados efeitos no peso corporal, peso das glândulas de seda e comprimento do fio de seda (40). De acordo com Chandrakala et al. (25), extratos vegetais podem não conter os principais nutrientes em quantidade suficiente, mas certamente contém fitoquímicos/aleloquímicos que podem influenciar o metabolismo larval do bicho-da-seda.

Grande é o número de estudos conduzidos com o objetivo de avaliar extratos de diferentes espécies de plantas, utilizadas como suplemento para o bicho-da-seda. Conforme Gururaja e Patil (41), o pó da semente de *Amaranthus* é rico em carboidratos, proteínas, ferro e caroteno, tendo efeito benéfico no *Bombyx mori* L., elevando a produção de seda devido ao aumento no peso do casulo e da casca sérica.

Extrato de café (*Coffea arabica*), quando aplicado sobre folhas de amoreira, sendo essas utilizadas na alimentação do bicho-da-seda, resultou em aumento no peso do casulo, indicando a presença de estimulantes de crescimento (42).

Diferentes concentrações de extrato da folha de *Acacia indica* e *Vitex negundo*, aplicadas no bicho-da-seda, promoveram ganhos significativos no peso de casca e comprimento do fio de seda (43).

Kumar et al. (44), embebendo folhas de amoreira em solução de micro alga azul-verde (*Spirulina*) e alimentando lagartas do bicho-da-seda, observaram, na concentração de 300 ppm, que os resultados para peso de casulo, peso de casca, peso de pupa e comprimento do fio foram significativamente superiores ao controle e aos tratamentos com 100 e 200 ppm.

Efeitos do *Tridax procumbens*, *Tribulus terrestris* e *Parthenium hysterophorus* foram observados no bicho-da-seda, com aumento significativo do peso larval em relação ao tratamento controle e diminuição da mortalidade larval (45).

O desenvolvimento larval e caracteres de produção do casulo do bicho-da-seda foram melhorados quando as lagartas foram alimentadas com folhas de amoreira enriquecidas com extrato de *Aloe vera* L. (46).

#### **Aspectos da alimentação do bicho-da-seda com dietas artificiais**

Grande parte dos conhecimentos acumulados sobre alimentação do bicho-da-seda, relacionados com suas necessidades nutricionais, composição química e física da folha de amoreira e as complexas relações inseto/planta foram obtidos em função dos avanços nos estudos com dietas artificiais (3).

A busca por um alimento preparado que substitua a folha da amoreira e atenda às exigências nutricionais do *Bombyx mori* L., possibilitando adequado desempenho biológico e produtivo, tem sido objeto de vários estudos. Essas pesquisas ganharam força a partir da

década de 60 e representaram importante avanço na criação do *Bombyx mori* L., tanto para fins experimentais quanto para fins comerciais, principalmente em países temperados, com tradição na Sericicultura (4).

No Japão, o desenvolvimento e uso de dietas artificiais na criação do bicho-da-seda tornou-se uma necessidade devido a fatores como a impossibilidade de produção da amoreira o ano todo, frente às condições adversas do clima, os altos custos de manutenção do amoreiral e criação das lagartas (colheitas e tratos) e as vantagens da aplicação dessa técnica para criação de lagartas “jovens” (1<sup>as</sup> ínstars) em cooperativas, possibilitando máximo rendimento na produção, melhor controle de patógenos, automatização e uso de dietas balanceadas e ricas em nutrientes (4).

O maior empecilho para a utilização de dietas artificiais em larga escala, na criação do bicho-da-seda, é o custo elevado. Conforme Yanagawa, Shinbo e Yamamoto (47), o custo calculado da dieta artificial é de cerca de 35% e 50% dos gastos totais da criação do bicho-da-seda, compreendendo os períodos do 1º ao 2º ínstar e do 1º ao 3º ínstar, em uma cooperativa de criação, respectivamente.

Nas regiões sericícolas do Brasil, as condições favoráveis de clima, na maior parte do ano, propiciam a produção e uso da amoreira para alimentação do bicho-da-seda, não havendo registros da utilização de dietas artificiais, mesmo para criação das lagartas nos primeiros ínstars. Embora não haja, no momento, demanda para uso dessa técnica na Sericicultura nacional, estudos vêm sendo conduzidos. Miranda e Takahashi (48) avaliaram a eficiência de utilização do alimento pelo bicho-da-seda, quando receberam, no 5º ínstar, diferentes dietas artificiais. A produção de casulos foi avaliada e comparada, entre lagartas de *Bombyx mori* L. alimentadas com dietas artificiais e com folhas de amoreira (49).

### **Perspectiva de nova técnica para suplementação**

Diferente dos países asiáticos, onde normalmente se colhem as folhas da amoreira para fornecimento ao bicho-da-seda (50), no Brasil padronizou-se o corte dos ramos, efetuados rente ao solo (baixo fuste) em plantas com 80 a 90 dias de brotação, após o último corte (51). Nesse sistema, embora sejam utilizadas técnicas que buscam maximizar a produção de massa foliar, com ótima qualidade alimentar para as lagartas (calagem, adubação, estágio de desenvolvimento da planta, cultivares, entre outros), processos degradativos são desencadeados logo após o corte da planta, perdurando por todo o período entre a colheita e utilização, com significativa perda na qualidade das folhas.

Conforme Nowak, Goszczynska e Rudnichi (52), as principais causas de danos pós-colheita são a exaustão de reservas, principalmente carboidratos pela respiração, a ocorrência de fungos e bactérias, responsáveis pela deterioração dos tecidos e o bloqueio dos vasos condutores do xilema, a produção de etileno, relacionado com a aceleração da senescência e a perda de água em excesso. O desbalanço hormonal e a ativação de enzimas associadas com o amarelecimento das folhas (perda de clorofila) também podem ser citados como processos biológicos que ocorrem nas plantas após a colheita (53).

Os ramos de amoreira, após o corte e por um determinado tempo, continuam realizando suas funções vitais, como transpiração, respiração e reações bioquímicas. Narasimhamurty, Donatus e Pillai (54) observaram decréscimo nos conteúdos de proteína total e carboidratos de folhas da amoreira após 12 horas de preservação em câmara de folhas, embora não tenham notado mudanças significativas nos conteúdos de polissacarídeos e lipídeos quando comparados com folhas frescas. Para esses autores, a redução nos conteúdos de proteína e carboidratos das folhas pode ser devido ao aumento da proteólise (quebra da proteína em aminoácidos) e ao consumo de certa quantia de carboidratos para o metabolismo oxidativo durante a respiração. Conforme Singh et al. (55), uma considerável perda de umidade e exaustão de nutrientes na folha da amoreira ocorre no período entre sua colheita e utilização

na alimentação das lagartas, principalmente em países tropicais devido à alta taxa de transpiração.

Considerando a forma como a amoreira é manejada no Brasil, sendo toda a parte aérea colhida (caule e folhas: ramos), e as perdas que ocorrem durante os processos de colheita, transporte, armazenamento e utilização, algumas similaridades podem ser observadas, quando se compara a Sericicultura com outros sistemas produtivos. Assim, na Horticultura e em alguns setores da Floricultura (flores de corte), também ocorre o corte da parte aérea, ficando o material sujeito aos processos catabólicos e perdas na qualidade. Nessas atividades citadas, a técnica de aplicação de soluções nutrientes e conservantes no período do pós-colheita é muito difundida, tendo por objetivo retardar a deterioração e aumentar a durabilidade das plantas.

Segundo Brackmann (56), o aumento da longevidade de flores de corte tem por base o fornecimento de água e açúcares para a continuidade das atividades metabólicas. A sacarose é muito utilizada nas soluções de manutenção de flores de corte, repondo carboidratos consumidos pela respiração e proporcionando redução na transpiração das flores e folhas, uma vez que age no fechamento dos estômatos e na regulação osmótica dos tecidos (52).

Nas flores, a capacidade de absorção de água pela haste é uma função importante, sendo que seu bloqueio provocará o murchamento prematuro, pois o processo de transpiração continua e não ocorre ganho líquido de água pelos tecidos vegetais (57). A obstrução dos vasos condutores de água das hastes pode ser ocasionada pela proliferação de micro-organismos como fungos e bactérias, assim como por embolia por ar ou como uma resposta fisiológica da planta ao corte do caule (58).

O crescimento de micro-organismos nos vasos condutores pode ser inibido pelo uso de germicidas. Assim, reduz-se o bloqueio vascular estimulando a absorção de água e a manutenção da turgidez (52). Nas soluções de manutenção de flores, além dos açúcares e germicidas, outros compostos são utilizados, como íons prata, cobalto, potássio, alumínio e cálcio, ácidos orgânicos e seus sais, antioxidantes, inibidores de etileno e os reguladores vegetais, como auxinas, giberelinas e citocininas (59).

Diante dos resultados positivos, relacionados com o aumento da longevidade de flores de corte tratadas com soluções nutritivas/conservantes, abre-se a possibilidade de adaptação da técnica para aplicação em ramos de amoreira, durante o período de armazenamento. Alguns benefícios poderiam ser obtidos, como o retardo dos processos degradativos, aumentando o tempo de armazenamento, além de ser um meio de se prover água e nutrientes para o enriquecimento nutricional das folhas e conseqüentemente suplementar a alimentação do bicho-da-seda.

Porto (60) testou um sistema de armazenagem onde ramos de amoreira receberam cobertura úmida e as extremidades basais foram imersas em água. Por essa técnica, a umidade e composição nutricional das folhas da amoreira foram mantidas, com teores apropriados para alimentação do bicho-da-seda, por um período de armazenamento de até 72 horas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando se aborda o tema nutrição animal, para a maioria das espécies de interesse zootécnico, depara-se com uma gama enorme de variáveis que envolvem desde os alimentos utilizados, suas diferentes categorias e combinações, formas de processamento, tipos de suplementos, até as necessidades nutricionais do organismo, conforme a espécie, idade, sexo e produção.

Para o bicho-da-seda, embora sejam utilizadas dietas artificiais em situações específicas, o alimento básico das lagartas é a folha da amoreira. Essa opção aparentemente restringe a nutrição do inseto a um único alimento, cuja variação qualitativa dependerá dos fatores relacionados com a planta.

O levantamento e apresentação das principais técnicas, estratégias e substâncias para suplementação alimentar do bicho-da-seda, utilizando a folha da amoreira como substrato, dará ao produtor novas perspectivas e alternativas para um manejo nutricional mais dinâmico, possibilitando a adequação do alimento a diferentes necessidades, conforme o ínstar, época do ano, exigências específicas de nutrientes e mesmo a administração de medicamentos, contribuindo assim para o desenvolvimento da Sericicultura Nacional.

## REFERÊNCIAS

1. Silveira Neto S, Nakano O, Barbin D, Villa Nova NA. Manual de ecologia dos insetos. São Paulo: Editora Agronômica Ceres; 1976.
2. Pizzamiglio MA. Ecologia das interações inseto/planta. In: Panizzi AR, Parra JRP. Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. São Paulo: Manole; 1991. p.101-21.
3. Hamamura Y. Silkworm rearing on artificial diet. Enfield: Science Publishers Inc.; 2001.
4. Chowdhary SK. Rearing of the silkworm, *Bombyx mori* L., on artificial diets: Retrospect and prospects. *Sericologia*. 1996;36:407-18.
5. Purohit KM, Kumar TP. Influence of various agronomical practices in India on the leaf quality in mulberry, a review. *Sericologia*. 1996;36:27-39.
6. Abramides P. Adubação do amoreiral. *Bol Ind Anim*. 1960;6:30-2.
7. Narayanan ES, Kasiviswanathan K, Iyengar MNS. Effects of varietal feeding, irrigation levels and nitrogen fertilization on the larval development and cocoon characters of *Bombyx mori* L. *Indian J Seric*. 1966;5:13-7.
8. Sudo M, Sho Y, Okajima T. The relation between the leaf quality at different leaf order and silkworm growth or cocoon quality. *J Seric Sci Jpn*. 1981;50:306-10.
9. Gomide JTB, Takahashi R. Efeito da adubação nitrogenada na produção da amoreira e sua influência na produção de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). *Cienc Zootec*. 1987;2:5-6.
10. Takahashi R. Efeito dos diferentes tipos de adubação na produção da amoreira (*Morus alba* L.) sua influência no desenvolvimento da glândula sericígena e na produção de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) [tese]. Jaboticabal: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 1988.
11. Munhoz REF, Mendes TA, Reginato ET, Gomes Neto G, Davies TR, Bravo JP, et al. A influência de cultivares de amoreira adubadas sobre características biológicas e

- produtivas do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). Arq Cienc Vet Zool UNIPAR. 2009; 12:129-34.
12. Bellizzi NC, Marchini LC, Takahashi R. Híbridos de amoreira adubados com matéria orgânica e gesso agrícola na produção de bicho-da-seda. Sci Agric. 2001;58:349-55.
  13. Shankar MA, Rangaswamy BT. Effect of applied Nitrogen and Potassium on mulberry leaf yield and quality in relation to silkworm cocoon characters. Better Crops Int. 1999;13:20-1.
  14. Sarker AA, Absar N. Foliar treatment effect of urea and micronutrients on mulberry (*Morus* sp.) and silkworm (*Bombyx mori* L.). Sericologia. 1995;35:713-20.
  15. Takahashi R. Adubação da amoreira e exigências nutricionais do bicho-da-seda. In: Anais do 13º Encontro Nacional de Sericicultura; 1995, Campinas. Campinas: CATI/SAA; 1995. p.37-46.
  16. Singhvi NR, Bose PC. Using foliar fertilization to increase the productivity of mulberry. Indian Silk. 1990;28:27-8.
  17. Fotedar RK, Chakrabarty S. Comparative studies on foliar and soil application of nitrogen on the leaf yield of mulberry. Indian J Seric. 1985;25:58-63.
  18. Dhiraj K, Kumar V. Application of foliar nutrients to increase productivity in sericulture. J Entomol. 2011;32:1-12.
  19. Rathinam KMS, Krishnan M, Chetty JS. Effect of minerals on the bioenergetics of the silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia. 1993;33:509-14.
  20. Subburathinam KM, Kabila V, Chetty JS. Mineral spray can increase cocoon quality. Indian Silk. 1990;28:35-6.
  21. Ashfaq M, Ahmad N, Ali A. Effects of optimum dosages of nitrogen, potassium, calcium and copper on silkworm, *Bombyx mori* L. development and silk yield. South Pac Study. 1998;18:47-50.
  22. Aslam M, Ashfaq M. Influence of methods of nutritional administration on the developmental and productive aspects of mulberry silkworm *Bombyx mori* L. Pak Entomol. 2004;26:43-5.
  23. Kanafi RR, Ebadi R, Mirhosseini SZ, Seidavi AR, Zolfaghari M, Etebari K. A review on nutritive effect of mulberry leaves enrichment with vitamins on economic traits and biological parameters of silkworm *Bombyx mori* L. Invertebrate Survival J. 2007;4: 86-91.

24. Zanlorenzi G, Lavorenti NA. Quantificação da influência do cloreto de colina na produção de casulos de *Bombyx mori* L. Rev Agric. 1981;56:31-3.
25. Chandrakala MV, Maribashetty VG, Gururaj CS, Dharani P, Sekharappa BM. Nutritional aspects and survival in the silkworm, *Bombyx mori* L. – a new perspective. Sericologia. 2007;47:347-57.
26. Babu M, Swamy MT, Kameshwar R, Seshagiri RM. Effect of ascorbic acid-enriched mulberry leaves on rearing of *Bombyx mori* L. larvae. Indian J Seric. 1992;31:111-4.
27. Etebari K, Ebadi R, Matindoost L. Effect of feeding mulberry's enriched leaves with ascorbic acid on some biological, biochemical and economical characteristics of silkworm *Bombyx mori* L. Int J Indust Entomol. 2004;8:81-7.
28. Nirwani RB, Kaliwal BB. Effect of thiamine on commercial traits and biochemical contents of the fat body and haemolymph in the silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia. 1998;38:639-46.
29. Etebari K, Matindoost L. Effects of hypervitaminosis of B3 on silkworm biology. J Biosci Bioeng. 2004;29:417-22.
30. Evangelista A, Carvalho AD, Takahashi R. Performance of silkworm (*Bombyx mori* L.) fed with vitaminic and mineral supplement. Rev Agric. 1997;72:199-204.
31. Etebari K, Matindoost L. Application of multi-vitamins as supplementary nutrients on biological and economical characteristics of silkworm *Bombyx mori* L. J Asia Pac Entomol. 2005;8:107-12.
32. Lu SL, Jiang ZD. Absorption and utilization of amino acids in mulberry leaves by *Bombyx mori* L. Acta Sericol Sin. 1988;14:198-204.
33. Sánchez MD. Mulberry: an exceptional forage available almost worldwide. In: Mulberry for animal production. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations-FAO; 2002. p.271-89.
34. Ullal SR, Narasimhanna MN. Handbook of practical sericulture. Bangalore: Central Silk Board; 1987.
35. Leonardi MG, Casartelli M, Fiandra L, Parenti P, Giordana B. Role of specific activators of intestinal amino acid transport in *Bombyx mori* larval growth and nutrition. Arch Inset Biochem Physiol. 2001;48:190-8.
36. Laz R. Effects of methionine and tryptophan on some quantitative traits of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). Univ J Zool Rajshahi Univ. 2010;28:15-9.

37. Polycarpo GV, Nicodemo D, Fruchi VM, Silva AAR. Enriquecimento da dieta do bicho-da-seda com extrato hidrossolúvel de soja [Internet]. Jaboticabal; 2010 [acesso em 2010 Ago 20]. Disponível em: [http://www.prope.unesp.br/xxi\\_cic/27-33814174879.pdf](http://www.prope.unesp.br/xxi_cic/27-33814174879.pdf)
38. Sedano AA, Nubiato KEZ, Fernandes J, Nagata MM, Takahashi LS, Nicodemo D. Peso de casulos do bicho-da-seda alimentados com folhas de amoreira enriquecidas com treonina e valina. In: Anais do 2º Simpósio de Ciências Aplicadas a Sericicultura; 2010, Cascavel. Cascavel: Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2010. p.31-2.
39. Radjabi R. Effect of mulberry leaves enrichment with amino acid supplementary nutrients on silkworm, *Bombyx mori* L. at north of Iran. *Acad J Entomol.* 2010;3:45-51.
40. Murugan K, Jeyabalan D, Senthikumar N, Senthilnathan S, Sivaprakasam N. Growth promoting effect of plant products on silkworm – A biotechnological approach. *J Sci Ind Res.* 1998;57: 740-5.
41. Gururaja GK, Patil GM. Impact of potassium iodide, *Amaranthus* grain powder on silk output. *Indian Text J.* 1997;62:62-3.
42. Jeypaul C, Padmalatha C, Ranjt Singh AJA, Murugesan AG, Dhasarathan P. Effect of plant extracts on nutritional efficiency in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian J Seric.* 2003;42:128-31.
43. Sujatha K, Rao AP. Efficacy of certain botanicals against disease and post cocoon characters of silkworm, *Bombyx mori* L. *J Exp Zool.* 2004;7:229-35.
44. Kumar VR, Kumar D, Kumar A, Dhama SS. Effect of blue green micro algae (spirulina) on cocoon quantitative parameters of silkworm (*Bombyx mori* L.). *J Agr Biol Sci.* 2009;4:50-3.
45. Murugesan KA, Bhaskar RN. Efficacy of botanicals on larval growth of silkworm, *Bombyx mori* L. and its impact on silk productivity. *Bull Ind Acad Seric.* 2007;11:11-5.
46. Manimuthu M, Isaiarasu L. Influence of herbal tonic *Alloe* on the overall performance of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *J Biopest.* 2010;3:567-72.
47. Yanagawa H, Shinbo H, Yamamoto T. Recent studies on low-cost artificial diets and polyphagous silkworm in Japan (Sec II: *Bombyx mori*). In: Anais do 17º Congresso da Comissão Sericícola Internacional; 1997, Londrina. Londrina: Governo do Estado do Paraná; 1997. p.1-4.
48. Miranda JE, Takahashi R. Efficiency of food utilization by the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) fed on artificial diets. *Sericologia.* 1998;38:601-10.

49. Evangelista A, Takahashi R. Produção de casulos do *Bombyx mori* L. alimentado com dietas artificiais e folhas “in natura” de *Morus alba* L. *Acta Sci.* 2001;23:1055-8.
50. Singh GP, Mathur VB, Kamble CK, Datta RK. Young age rearing of silkworm, *Bombyx mori* L., a review. *Sericologia.* 1998;38:199-213.
51. Tinoco SJT, Porto AJ, Almeida AM, Souza CG, Okamoto F, Okawa H, et al. Manual de sericicultura. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral; 2000. (Manual Técnico, 75).
52. Nowak J, Goszczynska D, Rudnichi RM. Storage of cut flowers and ornamental plants: present status and future prospects. *Postharvest News Inf.* 1991;2:255-60.
53. Ferrante A. Fisiologia postraccolta dei fiori recisi M S Reid. *Italus Hortus.* 2006;13:29-41.
54. Narasimhamurth CV, Donatus E, Pillai SV. Chemical composition of mulberry during preservation and leaf storage. *Sericologia.* 1987;27:623-7.
55. Singh GP, Himanthraj MT, Mathur VB, Kamble CK, Datta RK. Use of anti-transpirants to preserve the mulberry leaves for young age silkworm, *Bombyx mori* L. rearing and its impact on cocoon production. *Sericologia.* 1999;39:629-33.
56. Brackmann A. Armazenamento de crisântemos *Dendranthema grandiflora* cv. Red Refocus em diferentes temperaturas e soluções conservantes [Internet]. São Paulo; 2008 [acesso em 2008 Maio 20]. Disponível em: <http://br.monografias.com/trabalho/armazenamento-crisantemos-temperatura/armazenamento-crisantemos-temperatura2htm>
57. Lima JD, Moraes WS, Silva CM. Tecnologia pós-colheita de flores de corte [Internet]. São Paulo; 2008 [acesso em 2008 Maio 20]. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/xivrifib/lima.PDF>
58. Ichimura K, Kojima K, Goto R. Effects of temperature, 8-hidroxyquinoline sulphate and sucrose on the vase life of cut rose flowers. *Postharvest Biol Technol.* 1999;15:33-40.
59. Castro CEF. Armazenamento de flores. *Casa Agric.* 1985;7:18-21.
60. Porto AJ. Valor alimentício da folha de amoreira (*Morus* sp.) para o bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) em função de sistemas de armazenagem dos ramos no pós-colheita [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2009.

**Recebido em: 07/12/11**

**Aceito em: 13/11/12**

## DIAGNÓSTICO DA HIDROCEFALIA EM ANIMAIS PELA ULTRASSONOGRAFIA, TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Alexandra Frey Belotta<sup>1</sup>  
Vânia Maria de Vasconcelos Machado<sup>2</sup>  
Luiz Carlos Vulcano<sup>3</sup>

### RESUMO

A hidrocefalia é caracterizada por um distúrbio na circulação do fluido cerebrospinal (FCS) que leva ao aumento do volume de líquido e consequente dilatação do sistema ventricular cerebral. O diagnóstico definitivo é realizado por métodos de imagem como a radiografia, ultrassonografia (US), tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM). Métodos de mensuração quantitativa dos ventrículos foram propostos por diversos autores para a detecção de ventriculomegalia por US, TC e RM. A US constitui-se de um método confiável, pouco oneroso e não invasivo. Entretanto, apenas pode ser utilizada em animais com fontanelas abertas quando se deseja uma boa resolução das imagens. A TC e RM são excelentes métodos para a obtenção de imagens seccionais, sem sobreposição de estruturas e com maior diferenciação entre tecidos moles. A RM torna-se mais vantajosa em relação à TC por permitir a obtenção de informação anatômica mais detalhada e da composição do cérebro hidrocefálico.

**Palavras-chave:** hidrocefalia; animais; diagnóstico por imagem.

### HIDROCEPHALUS DIAGNOSIS IN ANIMALS USING ULTRASONOGRAPHY, COMPUTERIZED TOMOGRAPHY AND MAGNETIC RESONANCE

#### ABSTRACT

Hydrocephalus is characterized by a disturbance in cerebrospinal fluid circulation, which leads to increased CSF volume and, as a consequence, enlarged cerebral ventricular system. The definitive diagnosis in live animals is accomplished by imaging methods such as radiography, ultrasonography (US), computerized tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI). Methods for quantitative measurement of the ventricles have been proposed by several authors for the detection of ventriculomegaly using US, CT and MRI. US is a reliable, inexpensive and noninvasive technique for the detection of ventricular enlargement. However, can only be used in animals with open fontanelles to acquire good image resolution. CT and MRI are excellent methods for obtaining cross sectional images without overlapping structures and have greater differentiation between soft tissue. MRI becomes advantageous compared to CT while allows to obtain more detailed anatomical information and the composition of the hydrocephalic brain.

**Keywords:** hydrocephalus; animals; imaging diagnosis.

### DIAGNÓSTICO DE HIDROCEFALIA EN ANIMALES MEDIANTE EL USO DE ECOGRAFÍA, TOMOGRAFÍA COMPUTADA Y RESONANCIA MAGNÉTICA

<sup>1</sup> Residente Área de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP - Botucatu

<sup>2</sup> Docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP – Botucatu

<sup>3</sup> Professor Titular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP - Botucatu

## RESUMEN

La hidrocefalia se caracteriza por una alteración en la circulación del líquido cefalorraquídeo que lleva el aumento de volumen de este y a la consecuente dilatación del sistema ventricular cerebral. El diagnóstico definitivo se realiza a través de métodos de imagen como la radiografía, la ecografía, la tomografía computada (TC) y la resonancia magnética (RM). Han sido propuestos varios métodos de medición cuantitativa de los ventrículos para la detección de ventriculomegalia por ecografía, TC y RM. La ecografía es una técnica confiable, barata y no invasiva para la observación de la dilatación ventricular. Sin embargo, solamente se obtiene buena resolución de imagen en animales cuyas fontanelas están abiertas. La TC y la RM son métodos excelentes para obtener imágenes de cortes transversales, sin superposición de estructuras y una mayor diferenciación entre los tejidos blandos. La RM tiene más ventajas en relación a la TC, ya que permite la obtención de información anatómica detallada y de la composición del cerebro hidrocefálico.

**Palabras claves:** hidrocefalia, animales, diagnóstico por imagen.

## INTRODUÇÃO

A hidrocefalia é o resultado de um distúrbio na dinâmica circulatória do fluido cerebrospinal (FCS) e caracteriza-se pelo aumento do volume do FCS e conseqüente dilatação dos ventrículos cerebrais (1).

A hidrocefalia congênita é a forma mais comumente encontrada na rotina de pequenos animais e freqüentemente ocorre em cães de raças pequena e miniatura dentro do primeiro ano de vida: Maltês, Yorkshire terrier, Buldogue inglês, Chihuahua, Lhasa apso, Pomerânio, Poodle, Pug, Chowchow e Pequinês são as raças mais relatadas. Gatos são afetados ocasionalmente (2).

Os sinais clínicos mais comumente descritos são ataxia, dificuldade de caminhar, andar em círculos e gagueira (3).

A ultrassonografia constitui um método confiável, pouco oneroso e não invasivo para a constatação de ventriculomegalia quando comparado à tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) (4). Entretanto, a melhor resolução obtida com a TC é vantajosa em relação à ultrassonografia na diferenciação da ventriculomegalia clinicamente significativa e da variação individual normal.

A TC é um excelente método para a obtenção de imagens seccionais, sem sobreposição de estruturas e com maior diferenciação entre tecidos moles, entretanto, várias estruturas não são visibilizadas diretamente (5).

A RM permite a obtenção de informação anatômica detalhada e da composição do cérebro hidrocefálico, como os danos causados à substância branca (6).

## REVISÃO DE LITERATURA

De Lahunta e Glass (7) classificaram a hidrocefalia como compensatória ou obstrutiva e, esta última, em adquirida ou congênita. Na hidrocefalia compensatória, uma enfermidade ocasiona a perda de parênquima encefálico e o volume do FCS aumenta ocupando o local dessa ausência de tecido sem que haja aumento da pressão do FCS. Alguns exemplos incluem hidranencefalia e a diarreia viral bovina que ocasiona hipoplasia e atrofia cerebelar. A hidrocefalia obstrutiva ocorre devido à obliteração do fluxo ou ausência de absorção de FCS gerando aumento da pressão do FCS e dilatação do sistema ventricular. Algumas causas de hidrocefalia obstrutiva adquirida incluem neoplasias (sendo os meningiomas mais comuns,

ependinomas, meduloblastomas, entre outros), hemorragia intracraniana, infecção/inflamação do sistema nervoso central e alterações degenerativas em cães. Essas várias alterações podem ocasionar hidrocefalia seja por fibrose das vilosidades da camada aracnóide impedindo a absorção do fluxo do FCS ou pela obstrução mecânica do fluxo.

Regiões anatômicas do sistema ventricular como o forame interventricular, aqueduto mesencefálico, aberturas laterais do quarto ventrículo e espaço subaracnóide, que apresentam diâmetro reduzido, são pontos comuns de obstrução (8).

Raramente, a hidrocefalia adquirida pode resultar de uma superprodução de FCS, como ocorre no papiloma de plexo coróide, comum em humanos (3).

A hidrocefalia obstrutiva congênita está associada a malformações que interferem na circulação ou absorção do FCS e tem sido atribuída à malformação do aqueduto mesencefálico e, raramente, à malformação das vilosidades da camada aracnóide. A primeira está frequentemente associada à fusão dos colículos rostrais e produz um aumento da pressão intraventricular com atrofia do tecido cerebral e distorção dos ossos moles da calvária – cabeça em forma de cúpula (7).

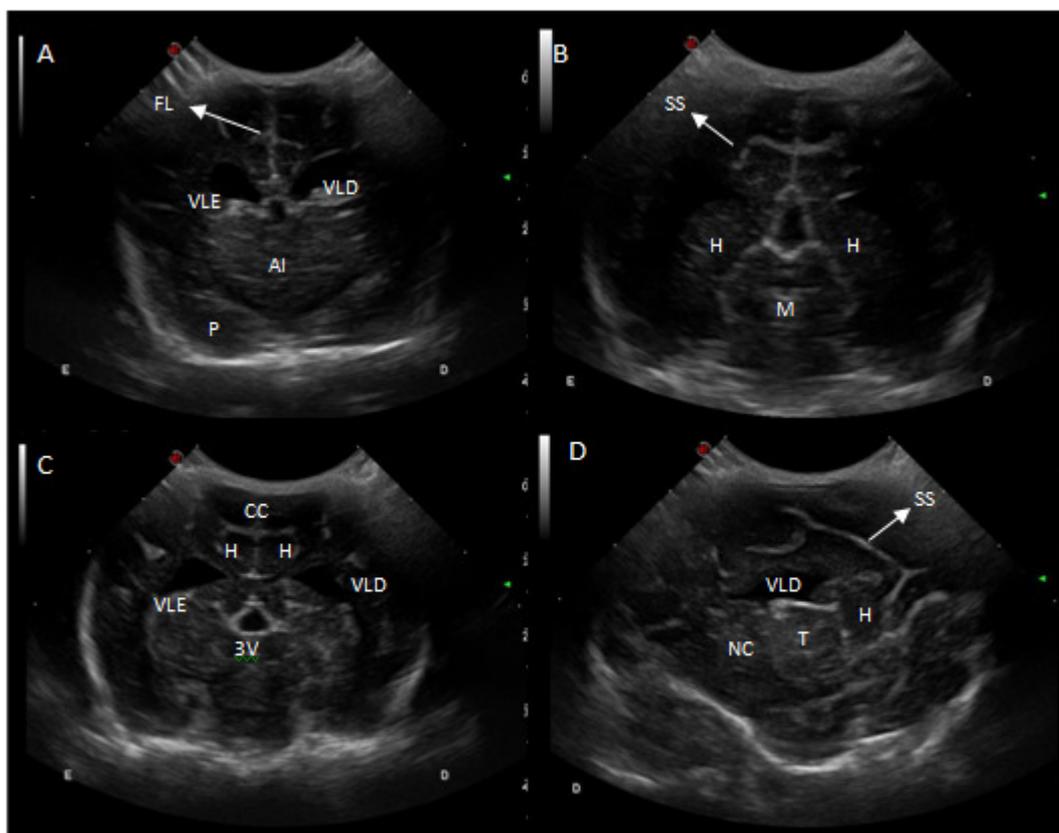
De Lahunta e Glass (7), também dividiram as hidrocefalias em comunicantes (não obstrutivas) – em que há dilatação ventricular secundária a obstrução extraventricular do fluxo de FCS – e não comunicantes – dilatação ventricular devido a uma obstrução intraventricular do fluxo de FCS.

### **Ultrassonografia**

A ultrassonografia como meio diagnóstico utilizado na investigação do encéfalo é rotineiramente empregada em animais jovens, cujas fontanelas permanecem abertas, servindo como janela acústica. Embora seu uso em animais adultos seja restrito devido à barreira proporcionada pelos ossos do crânio, Lorigados (5) concluiu que o exame pode ser realizado utilizando como janela acústica os ossos temporal e parietal, entretanto com resolução inferior das imagens. Estruturas como os ventrículos laterais e o terceiro ventrículo, o tecido cerebral com seus sulcos, a fissura longitudinal, corpo caloso, plexo coróide, núcleo caudado, vermis e o tentório do cerebelo foram passíveis de visibilização (9).

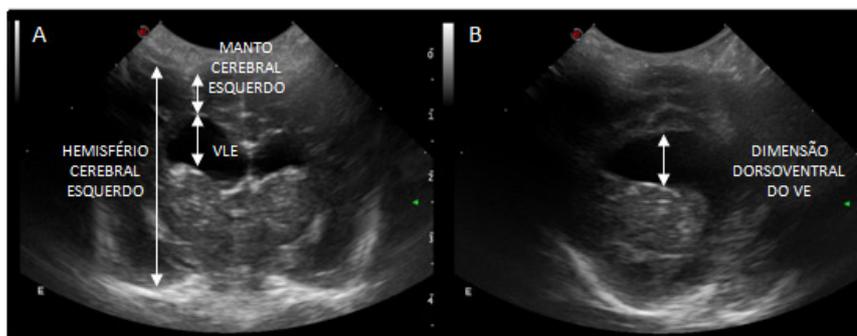
Alguns animais podem apresentar aumento de volume mínimo nos planos descritos para medida, mas ventrículos muito aumentados em outras áreas, como a parte caudal do corno central e o corno temporal (10). Entretanto, a ventriculomegalia não deve ser sempre igualada à hidrocefalia clinicamente significativa. As diferenças raciais e a gravidade dos sinais clínicos devem ser consideradas (11).

Vários métodos foram propostos por diferentes autores para mensurar quantitativamente os ventrículos laterais. De acordo com Hudson et al. (9), os ventrículos laterais são considerados aumentados quando sua altura excede, em corte transversal, na altura da aderência intertalâmica ou caudalmente, 0,35cm no seu eixo dorsoventral; quando excedem 0,19cm a relação ventrículo-hemisfério ou quando excedem 0,25cm a relação ventrículo-manto. Em corte sagital, a altura ventricular lateral não deve exceder 0,14cm. Spaulding e Sharp (10), classificaram como ventriculomegalia moderada quando a relação entre a medida dorsoventral do ventrículo lateral e a medida dorsoventral do cérebro encontram-se entre 15% e 25% e, como ventriculomegalia grave, quando a relação resulta acima de 25%.



FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Figura 1. Anatomia ultrassonográfica transcraniana de Pinscher, 3A, F, com hidrocefalia discreta. A) Corte transversal realizado na altura do tálamo; B) Corte transversal com o feixe apontando caudalmente para demonstrar o mesencéfalo; C) Sonograma realizado na altura da hipófise; D) Corte parasagital direito (FL: fissura longitudinal, SS: sulco esplenial do lado direito, VLE/D: ventrículo lateral esquerdo/direito, AI: aderência intertalâmica, P: lobo piriforme, H: hipocampo, M: mesencéfalo, CC: corpo caloso, 3V: terceiro ventrículo; NC: núcleo caudado.



FMVZ – UNESP – BOTUCATU

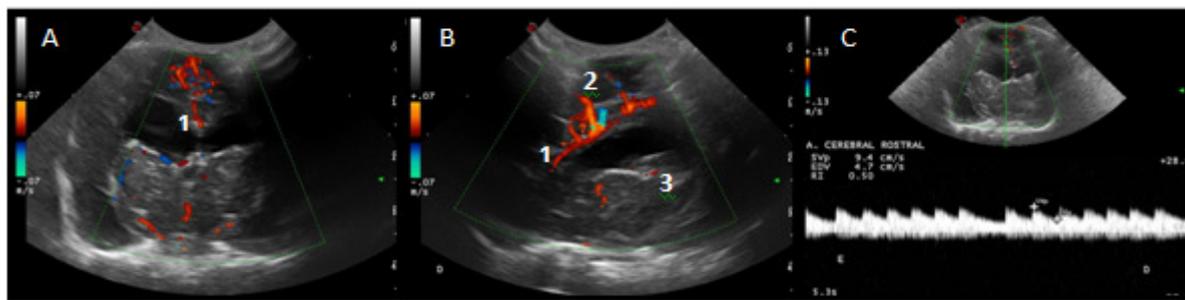
Figura 2. Yorkshire, 5M, hidrocefalia assimétrica de ventrículos laterais. A) Corte transversal: relação ventrículo-manto esquerdo e relação entre a dimensão dorsoventral do VE (ventrículo esquerdo) para a dimensão dorsoventral do hemisfério cerebral esquerdo; B) Corte parasagital: dimensão dorsoventral do VLE (ventrículo lateral esquerdo).

Em humanos, diversos vasos cerebrais foram mapeados e seus parâmetros caracterizados utilizando a ultrassonografia Doppler transcraniana. Entretanto, na Medicina Veterinária, existem poucos relatos em uma população limitada de pacientes (12). O índice de resistividade (IR) normal, de acordo com Seo et al. (12), varia entre  $0,55 \pm 0,04$ , sendo que não há diferença significativa entre as artérias cerebrais rostral e caudal.

Hudson et al. (9), realizaram ultrassonografia Doppler das artérias cerebral rostral, cerebral média e carótida interna de 19 cães neonatos e a maioria dos IR permaneceram entre 0,6 e 0,7 e não excederam 0,86.

O círculo arterioso dos cães, também conhecido como círculo de Willis, é suprido por três fontes: lateralmente pelas artérias carótidas internas (ramos terminais das artérias carótidas comuns) e caudalmente pela artéria basilar, que origina-se da união das artérias vertebrais. Dos ramos rostrais da artéria carótida interna, emergem as artérias cerebrais rostral e média (13).

Em estudo realizado por Saito et al. (14), verificou-se que o IR da artéria basilar era mais elevado em cães com hidrocefalia clínica quando comparado aos cães com hidrocefalia assintomática e, cães assintomáticos, com ventriculomegalia grave e IR elevado, mais tarde desenvolveram sinais clínicos. O aumento do IR ocorre devido a uma redução do fluxo sanguíneo no cérebro, cerebelo e tronco encefálico.



FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Figura 3. US Doppler colorido no corte transversal (A) e parassagital direito (B): 1-artéria cerebral rostral; 2-ramos calosos; 3-porção da artéria carótida interna. C) US Doppler espectral demonstrando índice de resistividade normal (0,5) da artéria cerebral rostral em cão com hidrocefalia clínica aguda.

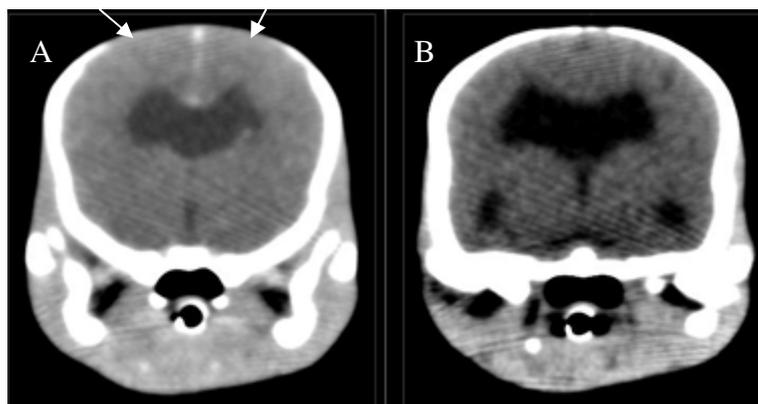
Carvalho et al. (4), ao realizarem ultrassonografia transcraniana em 32 cães com hidrocefalia diagnosticada ao modo B, observou que o IR reduzia de acordo com a melhora no estado clínico do animal, após medicação. Não houve alterações ao modo B em relação à melhora do paciente. As artérias cerebrais rostral, média e caudal foram mapeadas nos dois hemisférios em duas ocasiões: antes do tratamento clínico e após 30 dias de terapia com diuréticos e corticóides. Desse modo, a autora concluiu que o dúplex Doppler transcraniano é um método de avaliação hemodinâmica capaz de monitorar mais precisamente o tratamento da hidrocefalia em cães e verificar a resposta dos pacientes pelo IR das artérias cerebrais.

### Tomografia computadorizada e ressonância magnética

A maioria das pesquisas relacionadas a hidrocefalia encontradas na literatura utilizam a RM como método diagnóstico. Alguns estudos tomográficos e de ressonância envolvendo a hidrocefalia experimental em cães e ratos foram encontrados na literatura médica simulando o aumento da pressão do FCS e do volume ventricular após injeção de caulin ou outros agentes na cisterna magna. É de consenso geral que, apesar do possível diagnóstico da hidrocefalia pela ultrassonografia, a TC e a RM tornaram atualmente o diagnóstico da doença mais simples, revelando, em algumas ocasiões, a própria causa da obstrução liquórica. Permitem a visualização de anomalias congênitas (como a avaliação da extensão da atrofia cerebral), e lesões focais como massas intracranianas e processos traumáticos que possam levar à hidrocefalia.

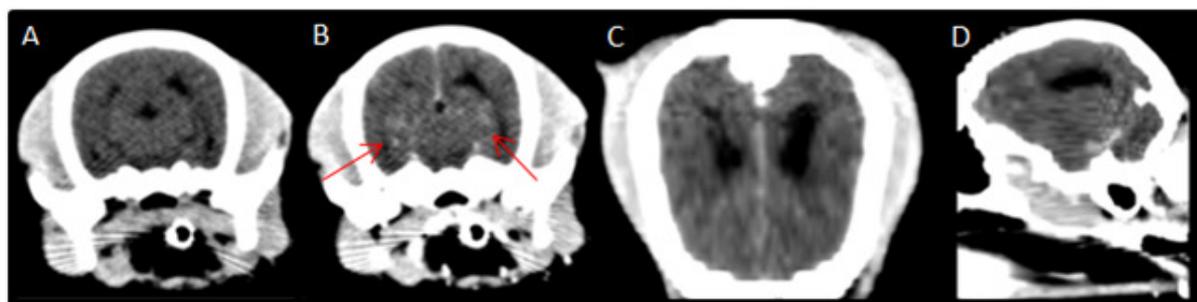
Os ventrículos laterais, terceiro e quarto ventrículos são bem definidos na tomografia computadorizada enquanto o aqueduto mesencefálico é pequeno demais para ser demonstrado. O FCS possui valores de absorção discretamente reduzidos em relação ao tecido

cerebral circundante e, portanto, sem qualquer alteração, o sistema ventricular aparece como áreas hipodensas circunscritas pela coloração hiperdensa do tecido cerebral (15).



FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Figura 4. TC. Onça, 45d, hidrocefalia congênita. A) Severa descontinuidade óssea de temporal bilateral (setas); B) Dilatação moderada de ventrículos laterais.



FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Figura 5. TC. Cão com suspeita de encefalite. A) Corte transversal do encéfalo na altura da hipófise antes e B) após a administração de meio de contraste com captação difusa (setas vermelhas). C) Corte dorsal e D) sagital demonstrando ventriculomegalia discreta.

De acordo com o local do sistema ventricular que encontra-se dilatado e a presença ou ausência de assimetria dos ventrículos laterais, pode-se sugerir a localização anatômica da lesão que está causando a ventriculomegalia: dilatação de apenas um dos ventrículos laterais pode sugerir uma lesão focal obstrutiva em topografia de forame interventricular ipsilateral, assim como dilatação apenas dos ventrículos laterais indica obstrução caudal ao terceiro ventrículo. Quando o terceiro ventrículo está dilatado, a lesão provavelmente situa-se em topografia do aqueduto mesencefálico e, quando inclusive o quarto ventrículo dilata-se, ocorre obstrução das aberturas laterais ou caudal a elas (16).

Garcia (17), por meio da TC realizou mensuração dos ventrículos laterais, terceiro ventrículo e volume ventricular total em 50 cães de diversas raças (a maioria deles Cocker e Golden Retriever). As médias encontradas foram: 463,93mm<sup>3</sup> para o volume ventricular lateral direito, 535,87mm<sup>3</sup> para o volume ventricular lateral esquerdo, 110,54mm<sup>3</sup> para o volume do terceiro ventrículo e 1110,50mm<sup>3</sup> para o volume ventricular total. A assimetria ventricular esteve presente em 62% dos cães, revelando um aumento predominante do ventrículo esquerdo. Outros autores também documentaram a assimetria dos ventrículos laterais como sendo normal (9, 17).

Nam et al. (18) realizaram mensurações da relação entre a altura do ventrículo em relação à altura do cérebro, da relação entre a área do ventrículo em relação à área do cérebro e do volume do ventrículo em relação ao volume cerebral em cães maltês com e sem hidrocefalia pela RM ao nível da aderência intertalâmica. Enquanto nos animais sadios as medidas foram menores que 15%, 7% e 5%, respectivamente; nos hidrocefálicos foram

maiores que 30%, 17% e 16%, respectivamente, o que significa que os três métodos são excelentes para a avaliação de hidrocefalia pela RM. Entretanto, outros estudos são necessários para investigar os valores de referência para outras raças.

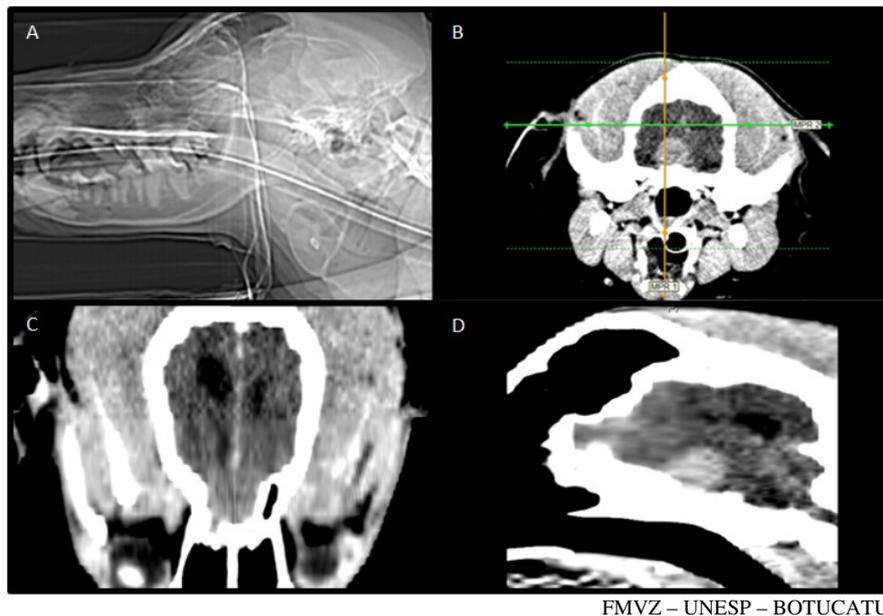


Figura 6. TC. Bernese Mountain Dog, 7A, F, suspeita de Histiocitoma maligno. A) Scout; B) Estrutura hiperdensa com realce após administração de contraste localizada em topografia de hipófise e estendendo-se para a direita levando a compressão do corno rostral do VLD e dilatação assimétrica; C) Corte dorsal e D) Corte parassagital direito: dilatação moderada do corno caudal do VLD.

Em condições normais, na RM, o sistema ventricular preenchido por FCS aparece hipointenso (escurido) na sequência de relaxamento T1 e hiperintenso (esbranquiçado) na sequência de relaxamento T2. A capacidade da RM de fornecer cortes anatômicos em múltiplos planos e com detecção de diferenças sutis nos tecidos permite uma avaliação mais precisa do sistema ventricular (8) e a torna ideal para a detecção antecipada de neoplasias precoces e quando a resolução de contraste de tecidos moles deve ser altamente detalhada (17). A RM também é superior à TC para definição de estenose do aqueduto mesencefálico e fusão do colículo rostral em casos de hidrocefalia obstrutiva congênita (19).

As encefalites e meningites, que podem levar à hidrocefalia devido à redução da absorção do FCS, costumam aparecer mais evidentes na sequência de relaxamento T2 e, na sequência FLAIR, como áreas de hiperintensidade multifocais no parênquima ou como um sinal hiperintenso na superfície do cérebro após administração de contraste. As neoplasias, que podem causar obstrução mecânica do fluxo, apresentam-se com variados aspectos: o meningioma (tumor cerebral mais comum em cães e gatos) geralmente aparece iso ou hipointenso na sequência de relaxamento T1 e com captação de contraste posterior (8).

### Hidrocefalia ex-vácuo

A hidrocefalia ex-vácuo - ou hidrocefalia externa - se refere ao aumento discreto ou não das dimensões ventriculares, secundário à perda de parênquima cerebral (8) e com a maior parte do FCS localizado no espaço subaracnóide circunscrivendo os giros cerebrais (20). A dinâmica do FCS responsável pelo desenvolvimento da hidrocefalia ex-vácuo ainda não foi elucidada, mas acredita-se que possa ocorrer como uma consequência da hidrocefalia interna severa (2). Em humanos, está frequentemente associada à macrocefalia em crianças como uma síndrome congênita, mas também foi relatada em adultos secundária à hemorragia subaracnóide. Na literatura são relatados sintomas neurológicos discretos e evolução favorável do quadro após tratamento (2, 20).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos de diagnóstico por imagem constituem a melhor ferramenta para a detecção da hidrocefalia em animais *in vivo*. Dentre eles, a US é o menos oneroso e não invasivo capaz de visibilizar ventriculomegalia em animais com fontanela aberta e mensurá-la. Apesar de existirem, na literatura, diversos experimentos buscando a padronização das mensurações ventriculares - em malteses, yorkshires, beagles, pastores alemão, cockers e goldens retriever com e sem hidrocefalia -, uma grande dificuldade no diagnóstico da hidrocefalia por meio dos cortes transversais de imagem seria a diferenciação entre variação normal do indivíduo e ventrículos laterais aumentados anormalmente. Portanto, mais estudos com maior número de amostragem e em outras raças, avaliados de acordo com peso e faixa etária, são necessários.

A TC e RM se tornam superiores à US no que diz respeito à possibilidade de serem realizados em animais com fontanelas fechadas, sem que haja perda de resolução da imagem por artefatos e na capacidade de realizar múltiplos cortes impedindo a sobreposição de estruturas. Portanto, permitem uma melhor definição dos ventrículos e possível visibilização da causa da obstrução líquórica, em alguns casos.

Apesar de ser uma modalidade diagnóstica restrita a poucas instituições e hospitais veterinários particulares no Brasil, a maioria dos artigos encontrados na literatura estrangeira utilizaram a RM, o que demonstra ser um método acessível em países desenvolvidos. Apresenta maior sensibilidade na resolução de contraste de tecidos moles permitindo a avaliação de estruturas como aqueduto mesencefálico e colículos rostrais, que frequentemente encontram-se alterados na hidrocefalia obstrutiva congênita. Também possui maior importância na definição das relações anatômicas de um tumor e estruturas normais envolventes bem como para a detecção de áreas sugestivas de inflamação do parênquima cerebral e meninges – causas comuns de hidrocefalia adquirida.

## REFERÊNCIAS

1. Vite CH, Braund KG. Braund's clinical neurology in small animals: localization, diagnosis and treatment [Internet]. Ithaca: International Veterinary Information Service; 2004 [cited 2002 Jan 24]. Available from: [http://www.ivis.org/special\\_books/braund/jones/ivis.pdf](http://www.ivis.org/special_books/braund/jones/ivis.pdf)
2. Dewey CW. External hydrocephalus in a dog with suspected bacterial meningoencephalitis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2002;38:563-7.
3. Mandara MT, Pavone S, Vitellozzi G. Internal hydrocephalus and associated periventricular encephalitis in a young fox. *Vet Pathol.* 2007;44:713-6.
4. Carvalho CF, Chammas MC, Andrade Neto JP, Jimenez CD, Diniz AS, Cerri GG. Transcranial duplex doppler in dogs with hydrocephalus. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2010;62:54-63.
5. Lorigados CAB. Utilização da ultra-sonografia modo B e da tomografia computadorizada no estudo do encéfalo de cães adultos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2008.
6. Del Bigio MR, Crook CR, Buist R. Resonance imaging and behavioral analysis of immature rats with kaolin-induced hydrocephalus: pre and postshunting observations. *Exp Neurol.* 1997;148:256-64.

7. De Lahunta A, Glass E. Cerebrospinal fluid and hydrocephalus. In: Veterinary neuroanatomy and clinical neurology. 3<sup>a</sup> ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2009. p.67-76.
8. Gavin PR, Bagley RS. Diagnosis of intracranial disease. In: Bagley RS, Gavin PR, Holmes SP. Practical small animal MRI. Ames: Wiley-Blackwell; 2009. p.54-97.
9. Hudson JA, Simpson ST, Buxton DF, Cartee RE, Steiss JE. Ultrasonographic diagnosis of canine hydrocephalus. *Vet Radiol Ultrasound*. 1990;31:50-8.
10. Spaulding KA, Sharp NJH. Ultrasonographic imaging of the lateral cerebral ventricles in the dog. *Vet Radiol Ultrasound*. 1990;31:59-64.
11. Hudson JA, Cox N. Nervous system. In: Penninck D, D'anjou M. Atlas of small animal ultrasonography. Iowa: Blackwell Publishing; 2008. p.14-9.
12. Seo M, Choi H, Lee K, Choi M, Yoon J. Transcranial doppler ultrasound analysis of resistive index in rostral and caudal cerebral arteries in dogs. *J Vet Sci*. 2005;6:61-6.
13. Carvalho CF, Dupré ASA, Perez RB. Ultrassom doppler transcraniano. In: Carvalho CF. Ultrassonografia doppler em pequenos animais. São Paulo: Roca; 2009. p.159-77.
14. Saito M, Olby NJ, Spaulding KA, Munana K, Sharp NJH. Relationship among basilar artery resistance index, degree of ventriculomegaly, and clinical signs in hydrocephalic dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 2003;44:667-94.
15. Potts DG, Gomez DG. Radiological studies of cerebrospinal fluid and hydrocephalus. *Exp Eye Res*. 1977;25:377-85.
16. Hecht S, Adams WH. MRI of brain disease in veterinary patients part 1: Basic principles and congenital brain disorders. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2009. 40:21-38.
17. Garcia BMF. Medição do volume do sistema ventricular cerebral em cães mesocefálicos [tese]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa; 2010.
18. Nam JW, Choi CB, Woo DC, Ryu KN, Kang EH, Chang HS, et al. Evaluation of hydrocephalic ventricular alterations in maltese dogs using low field MRI. *Intern J Appl Res Vet Med*. 2011;9:58-67.
19. Nycamp S, Scrivani P, De Lahunta A, Yu-Speight A. Chronic subdural hematomas and hydrocephalus in a dog. *Vet Radiol Ultrasound*. 2001;42:511-4.
20. Dewey CW, Coates JR, Ducoté JM, Stefanacci JD, Walker MA, Marino DJ. External hydrocephalus in two cats. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2003;39:567-72.

**Recebido em: 28/05/12**

**Aceito em: 30/01/13**

## SUPPURATIVE SIALADENITIS IN MANDIBULAR GLAND OF A DOG - ULTRASONOGRAPHIC ASPECT

Viviam Rocco Babicsak<sup>1</sup>  
Vanessa Kutz Arruda<sup>2</sup>  
Maria Claudia Lopes Silva<sup>2</sup>  
Maria Lucia Gomes Lourenço<sup>3</sup>  
Noeme Sousa Rocha<sup>3</sup>  
Luiz Carlos Vulcano<sup>4</sup>  
Maria Jaqueline Mamprim<sup>4</sup>

### ABSTRACT

Sialoadenitis is a rare inflammatory disease of salivary glands, which may be caused by infection, trauma or auto-immune disease. Ultrasonography is an imaging method considered extremely advantageous in the identification and assessment of glandular diseases. In this report we describe the cervical sonographic findings in a dog diagnosed with suppurative sialadenitis in bilateral mandibular gland.

**Keywords:** ultrasonography, suppurative sialadenitis, dog.

### SIALOADENITE SUPURATIVA EM GLÂNDULA MANDIBULAR DE UM CÃO – ASPECTO ULTRASSONOGRÁFICO

#### RESUMO

A sialoadenite é uma rara afecção inflamatória das glândulas salivares, que pode ter como causas infecção, trauma ou doença imunomediada. A ultrassonografia é considerada um método de imagem extremamente vantajoso na identificação e avaliação de doenças glandulares. Nesse relato descrevemos os achados ultrassonográficos cervicais em um cão diagnosticado com sialoadenite supurativa em glândula mandibular bilateral.

**Palavras-chave:** ultrassonografia, sialoadenite supurativa, cão.

### SIALOADENITIS SUPURATIVA EN GLÂNDULA MANDIBULAR DE UN PERRO - ASPECTO ECOGRÁFICO

#### RESUMEN

La sialoadenitis es una enfermedad inflamatoria rara de las glándulas salivares, que puede ser provocada por infección, trauma e enfermedad autoinmune. El ultrasonido es un método imagenológico considerado valioso para la identificación y evaluación de las enfermedades glandulares. En este reporte se describen los hallazgos ecográficos cervicales en un perro con diagnóstico de sialoadenitis supurativa bilateral en las glándulas mandibulares.

**Palabras clave:** ecografía, sialoadenitis supurativa, perro.

<sup>1</sup> Pós-graduanda do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

<sup>2</sup> Residente do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

<sup>3</sup> Docente do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

<sup>4</sup> Docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

## INTRODUCTION

Sialoadenitis, despite being a rare disease in small animals, is the most common lesion that affects the salivary glands. This inflammatory condition can be caused by several factors, including trauma, infection and immune-mediated disease (1). The acute suppurative process commonly affects the parotid salivary gland, whereas the mandibular involvement is a rare condition. Generally, in human, suppurative sialoadenitis is caused by ascendant migration of agents from septic focus in oral cavity, such as chronic tonsillitis and dental sepsis, in patients with reduced salivary flow (2).

The patients affected by sialoadenitis show an enlargement of the salivary glands, which can be unilateral (3) or bilateral (4). Hypersialism and pain are also common clinical manifestations (4). Ultrasonography is an important imaging modality for evaluation of the salivary glands based on their accessibility, reliability and cost, besides having the advantage of not exposing the patient to radiation and not requiring anesthesia (5). In this case report we describe the cervical sonographic findings in a dog diagnosed with suppurative sialadenitis in bilateral mandibular gland.

## CASE REPORT

A 7-year-old male mixed breed dog showing apathy, anorexia and an enlargement of bilateral submandibular structures, which first began in the right portion, was seen at a veterinary hospital and submitted to a cervical ultrasonography in order to aid in the diagnosis determination. An enlargement (more pronounced in the right frame) and a decrease in the echogenicity of the mandibular lymph nodes were observed in the ultrasonographic examination, however, no significant changes in their contour and echotexture, which were regular and homogeneous, respectively, were identified (Figure 1). The mandibular salivary glands (Figure 1), which measured approximately 1.76 cm (left) and 2.46 cm (right) long, showed a slightly heterogeneous echotexture, a reduced echogenicity and a hypervascularization in color Doppler imaging.

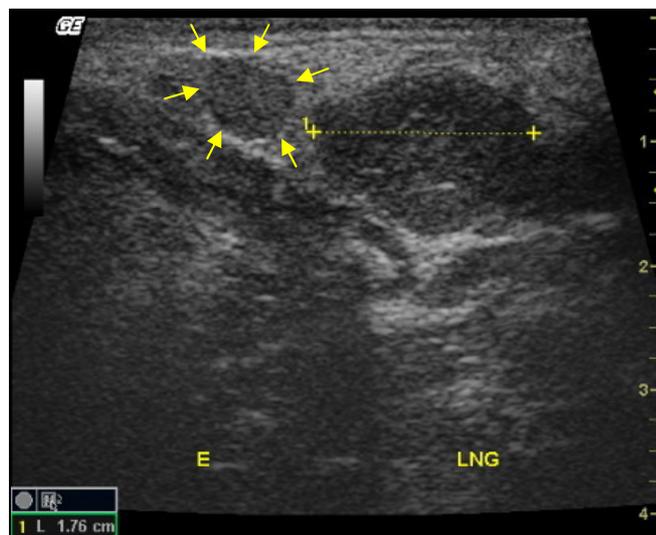


Figure 1. Oblique longitudinal ultrasonographic image illustrating the left mandibular salivary gland (between calipers), which measured approximately 1.76 cm long, with a slightly heterogeneous echotexture and a decreased echogenicity. Enlarged mandibular lymph node, which measured approximately 0.84 cm width, with a decrease in echogenicity can also be noted in the image (between arrows).

In the medial region of the right mandibular salivary gland was observed a hypoechogenic area with partially defined limits, measuring approximately 0.65 cm diameter, suggestive of abscess (Figure 2).

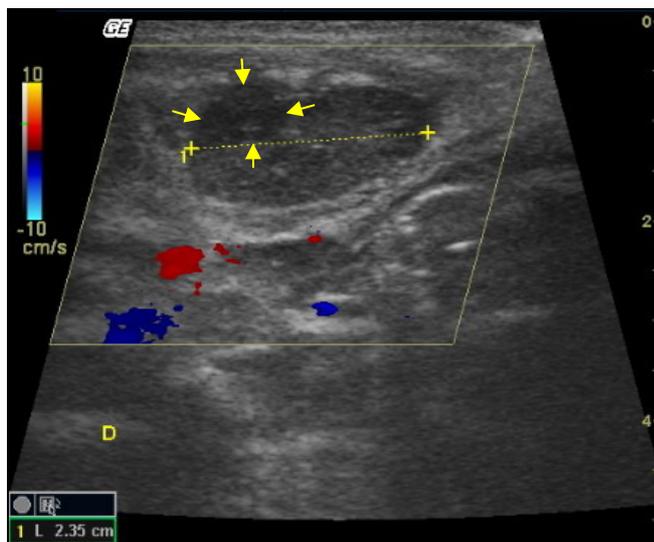


Figure 2. Transversal sonographic illustration demonstrating the hypoechogenic area (between arrows), suggestive of abscess, with partially defined limits, measuring approximately 0.65 cm diameter, in the medial region of the right mandibular salivary gland (between calipers).

Ultrasonography also allowed the verification of a hypoechoic linear structure, measuring 0.14 cm height, originating from the ventral portion of the bilateral mandibular salivary gland and extending to mandibular bone area, compatible with the dilated right mandibular salivary duct (Figure 3).

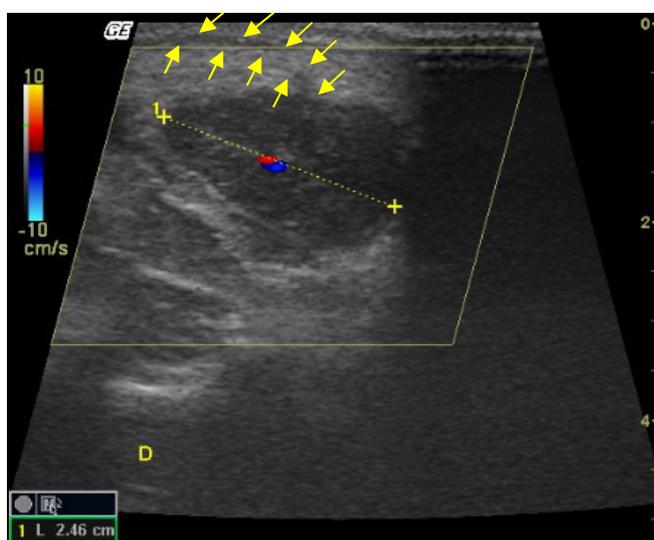


Figure 3. Transversal sonographic image showing the dilated right mandibular salivary duct (between arrows), a hypoechogenic linear structure, which measured 0.14 cm height, originated from the ventral region of the salivary gland (between calipers). The vascularization of the salivary gland can also be noted by color Doppler imaging.

Later, under ultrasonographic guidance, collection of material from bilateral mandibular salivary glands was performed by fine needle aspiration to cytological examination, which indicated the presence of a suppurative sialoadenitis. The patient was submitted to an antibiotic treatment, resulting in a total regression of the cervical volume in two days.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

Sonographically, normal salivary glands are presented as slightly hypoechoic and homogeneous structures, however, in cases of acute sialoadenitis, the sonographic findings may be variable depending on the stage of evolution. Initially, the affected salivary glands only show a volumetric increase and a well defined limit. In a later stage, a decreased echogenicity and a heterogeneous echotexture can be visualized in the salivary glands, as observed in the case reported, indicating the existence of an edematous process in these structures (6).

Dilated salivary ducts can also be observed in ultrasonographic images, as identified in this case report, which can be filled with a purulent content in cases of suppurative sialadenitis. In salivary glands affected by this condition, hypoechogenic or anechogenic areas with slightly irregular and poorly defined limits can be identified within them, suggesting the existence of abscesses (7). In the animal reported a hypoechogenic area with similar sonographic appearance to the one mentioned above was observed in the right gland. Due to the sonographic aspect and the cytological alterations, an abscess was potentially suggested.

Other sonographic changes as hypervascularization of the salivary glands in color Doppler imaging and regional lymphadenopathy, both found in the animal reported, may also be observed in cases of sialoadenitis (6). In lymphadenopathy, the lymph nodes may be enlarged, rounded shaped and with a decreased echogenicity (8). In the patient reported, an enlargement of mandibular lymph nodes was verified since they presented a width greater than 0.5 cm (8). The measurements of the right and left lymph nodes were approximately 1.15 cm and 0.84 cm, respectively. The right structure presented a larger size, possibly due to an initial involvement of it since a right cervical enlargement was firstly observed.

Ultrasound can also aid in the diagnosis confirmation since, under ultrasonographic guidance, it is possible to collect material for cytological examination by fine needle aspiration or for histopathological examination by biopsy. This imaging modality allows the selection of the most representative area to collection be done. Ultrasound also enables the visualization of the tissue to be aspirated, and therefore, especially with the use of Color Doppler, it is used to ensure that there are no intervening vascular structures in the area selected to the collection procedure, in order to promote patient safety (9). In the animal reported, the material collection was safely performed, without any complication after the procedure.

Ultrasonography is an imaging modality of great importance for the diagnosis of salivary gland diseases such as sialoadenitis, as it enables the evaluation of glandular and extra-glandular structures and allows a safe collection of material, aiding therefore, in the determination of the definitive diagnosis.

## REFERENCES

1. Spangler W, Culbertson MR. Salivary gland disease in dogs and cats: 245 cases (1985-1988). *J Am Vet Med Assoc.* 1991;198:465-9.
2. Bradley PJ. Microbiology and management of sialadenitis. *Curr Infect Dis Rep.* 2002;4:217-24.
3. Simison WG. Sialadenitis associated with periorbital disease in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1993;202:1983-5.
4. McGill S, Lester N, McLachlan A, Mansfield C. Concurrent sialocoele and necrotizing sialadenitis in a dog. *J Small Anim Pract.* 2009;50:151-6.

5. Zenk J, Iro H, Klintworth N, Lell M. Diagnostic imaging in sialadenitis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2009;21:275-92.
6. Brown J, Grees H, Zenk J. Diagnostic and imaging methods. In: Nahlieli O, Iro H, McGurk M. *Modern management preserving the salivary glands.* Herzeliya, Israel: Isradon; 2007. p.29-67.
7. Traxler M, Schurawitzki H, Ulm C, Solar P, Blahout R, Piehslinger E, et al. Sonography of nonneoplastic disorders of the salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1992;21:360-3.
8. Zwingenberger A, Wisner E. Neck. In: Penninck D, d'Anjou MA. *Atlas of small animal ultrasonography.* Iowa: Blackwell Publishing; 2008. p.91-117.
9. Nyland TG, Mattoon JS, Herrgesell EJ, Wisner ER. Ultrasound-guided biopsy. In: *Small animal diagnostic ultrasound.* 2<sup>a</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 2002. p.30-48.

**Recebido em: 22/06/12**

**Aceito em: 13/12/12**

## COMPLICAÇÕES PÓS-CIRÚRGICAS APÓS A EXCIÇÃO DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS NA REGIÃO PERIANAL EM FÊMEA EQUINA

Rogério Elias Rabelo<sup>1</sup>  
Valcinir Aloísio Scalla Vulcani<sup>1</sup>  
Fabiano José Ferreira de Sant'Ana<sup>1</sup>  
Felipe Roncato Vicentin<sup>2</sup>  
Panmera Almeida Helrigel<sup>2</sup>  
Juliana Ferreira Batista<sup>2</sup>

### RESUMO

O objetivo deste artigo foi relatar as intercorrências após ressecção cirúrgica de carcinoma de células escamosas (CCE) em uma égua e as medidas de tratamento adotadas no pós-operatório. Foi atendida no Setor de Cirurgia de Grandes Animais do Campus Jataí - UFG, uma fêmea equina de cinco anos de idade, com a presença de neoplasia proliferativa, com diâmetro médio de 13 cm, localizada na região perianal e peri-vulvar, cuja avaliação histopatológica revelou tratar-se de CCE. Dois dias após a remoção do tumor, o animal entrou em quadro de cólica, cuja sintomatologia persistiu por 20 dias, sendo adotado tratamento clínico e remoção manual de fezes, pois havia dificuldade de defecação, em virtude de prováveis lesões na musculatura adjacente, bem como no esfíncter anal. A insistência no tratamento proposto foi efetivo, pois assim que a ferida cirúrgica cicatrizou e o animal restabeleceu a capacidade de movimentação do esfíncter, o trânsito intestinal normalizou.

**Palavras-chave:** cólica, esfíncter anal, carcinoma células escamosas, equinos.

### POST-SURGICAL COMPLICATIONS AFTER PERIANAL AND PERIVULVAR SQUAMOUS CELLS CARCINOMA RESECTION IN MARE

#### ABSTRACT

The aim of this paper was to report the complications after surgical resection of squamous cell carcinoma (SCC) in a mare and treatment measures adopted in the postoperative period. It was attended in Large Animal Surgery Department, Campus Jataí - UFG, a female equine, five years old, with nodule in perianal and peri-vulvar region, whose histopathological evaluation revealed CCE. Two days after tumor removal, the animal entered in colic, which symptomatology persisted for 20 days, been adopted clinical treatment and manual removal of feces, because the defecation was difficult by damage to the adjacent muscle and anal sphincter. The insistence of the proposed treatment was effective, as soon as the wound healed and the animal recovered the ability to move the sphincter, the intestinal transit normalized.

**Keywords:** colic, anal sphincter, squamous cell carcinoma, horses.

### LAS COMPLICACIONES POSTQUIRÚRGICAS DESPUÉS DE RESECCIÓN DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS PERIANAL Y PERIVULVAR EN MARE

<sup>1</sup> Professor Adjunto do curso de Medicina Veterinária- CAJ/UFG

<sup>2</sup> Discente do curso de Medicina Veterinária - CAJ/UFG

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue reportar las complicaciones posteriores a la resección quirúrgica de carcinoma de células escamosas (CCE) en equinos y el tratamiento adoptado en el período postoperatorio. Una hembra equina de cinco años de edad con presencia de nódulos en la región perianal y perivulvar fue atendida en el Departamento de Cirugía de Grandes Animales de la UFG/Campus Jataí, la evaluación histopatológica reveló que se trataba de CCE. Dos días después de la extirpación del tumor, el animal presentó un cuadro de cólicos. La sintomatología persistió durante 20 días, siendo adoptado tratamiento clínico y remoción manual de las heces, hubo dificultad en la defecación por probables daños en los músculos adyacentes, así como en el esfínter anal. La insistencia del tratamiento propuesto fue efectiva, pues tan pronto como la herida quirúrgica cicatrizó y el animal recuperó la capacidad de control de movimientos del esfínter, el tránsito intestinal fue normalizado.

**Palabras clave:** carcinoma células escamosas, cólico, equinos, esfínter anal.

## INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é o segundo tipo mais comum de neoplasia cutânea em equinos, cujas regiões anatômicas mais acometidas são pálpebras, prepúcio e vulva (1). A ocorrência do tumor intensifica-se, principalmente, nos animais que possuem regiões despigmentadas e desprovidas de pelos e sujeitas à radiação solar (2). As lesões podem se apresentar isoladas ou múltiplas, com tamanhos variados e ulceradas (3).

As principais consequências da exérese cirúrgica de neoplasias nas regiões perianais e peri-vulvares são lesões em músculos e nervos, comprometendo a motilidade intestinal, principalmente do reto e esfínter anal (2, 4). Acrescenta-se ainda, o fato que a própria manobra cirúrgica pode provocar dor no período pós-cirúrgico e dificultar o movimento normal de defecação (5-7).

O objetivo deste artigo foi relatar as intercorrências após ressecção cirúrgica de CCE perianal e peri-vulvar em uma égua e as medidas de tratamento adotadas no pós-operatório.

## RELATO DO CASO

Foi atendida no Setor de Cirurgia de Grandes Animais (SCGA) do Campus Jataí - UFG, uma fêmea equina, raça Quarto de Milha de cinco anos de idade, com a presença de nódulo cutâneo firme com, aproximadamente 13 centímetros de diâmetro, ulcerado, com superfície irregular, na região perianal e peri-vulvar (Figura 1). Realizou-se hemograma e leucograma, que não apresentaram alterações dignas de nota.



Figura 1. Massa neoplásica proliferativa na região perianal e perivulvar de fêmea equina, raça Quarto de Milha. Notar superfície irregular e ulcerada

Realizou-se biópsia e encaminhou-se a amostra da neoplasia para exame histopatológico que confirmou tratar-se de CCE. Decidiu-se, então pela exérese cirúrgica do tumor. O animal, após prévio preparo do campo operatório, foi submetido a jejum, sedação e analgesia com cloridrato de detomidina, por via intravenosa (0,02mg/Kg) e bloqueio epidural caudal com cloridrato de lidocaína a 2% na (0,2 mg/Kg) associado ao cloridrato de xilazina a 2% (0,17mg/Kg) (7). Após tricotomia, remoção das fezes e obstrução do reto com compressa cirúrgica, fez-se incisão cutânea margeando a área tumoral e dissecação roma. A neoplasia infiltrava-se nos músculos semitendíneo e semimembranoso, com profundidade aproximada de doze centímetros (Figura 2). O espaço morto foi reduzido com fio absorvível tipo catagute por meio de sutura contínua simples. A dermorrafia foi realizada em padrão separado simples, empregando fio de poliamida nº1.

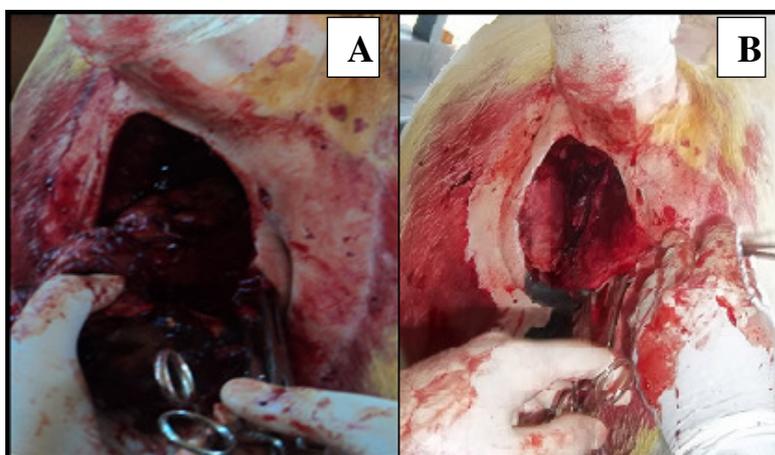


Figura 2. Aspecto do local após a ressecção da lesão tumoral. A dissecação do tumor revelou uma infiltração nos músculos semitendinoso e semimembranoso

Após recuperação anestésica, o animal foi solto em piquete e medicado com antibiótico à base de penicilina benzatina (20.000 UI/kg) a cada 48 horas por quatro dias e antiinflamatório não esteroideal à base de flunixin meglumine (1,1 mg/Kg) a cada 12 horas por três aplicações. Após uso do flunixin meglumine, utilizou-se dipirona sódica por mais cinco aplicações na dose de 25mg/kg a cada oito horas.

Após dois dias da cirurgia, notou-se que este apresentava, em pelo menos um período do dia, tenesmo e mímica de dor abdominal. Ao exame clínico, verificou-se tempo de

preenchimento capilar e temperatura normais, taquicardia e taquipnéia. A auscultação da fossa paralombar e do abdômen ventral direito e esquerdo revelaram hipomotilidade do ceco e do cólon. À palpação notou-se fezes ressecadas na ampola retal. O quadro de cólica apresentou-se intermitente nos dias seguintes, realizando-se, então, a administração de flunixin meglumine (1,1 mg/Kg), remoção das fezes duas vezes ao dia e administração de óleo mineral, via sonda nasogástrica (5ml/kg) (6), uma vez ao dia, por dez dias. Como outras intercorrências, ao sétimo dia do pós-cirúrgico houve deiscência parcial da ferida, sendo observada retração parcial da parede lateral do reto. Preconizou-se lavagem local com solução de Dakin e uso de pomada auxiliar do processo de cicatrização. Aos 45 dias, o paciente recebeu alta, sendo recomendada ao proprietário observação do animal, devido ao risco de recidiva da enfermidade (Figura 3).

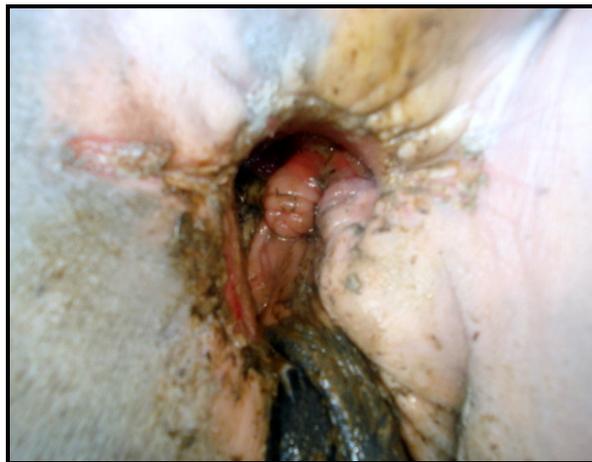


Figura 3. Deiscência parcial da ferida cirúrgica verificada ao sétimo dia após a ressecção da massa tumoral. Notar retração lateral da parede retal

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A suspeita clínica de CCE baseou-se em aspectos multifatoriais, com destaque para a anamnese, aspecto da lesão, localização anatômica, cor da pele e pelagem e os dados obtidos pelo exame clínico (8). A confirmação do diagnóstico só ocorreu após o exame histopatológico, cujos resultados concordaram com a literatura (8-10).

Devido à proximidade da ampola retal, músculos, nervos e esfíncter anal, acredita-se que danos a essas estruturas anatômicas, mostraram-se inevitáveis, justificando as complicações relatadas. A defecação constitui-se em um ato reflexo no qual as fezes são descarregadas do cólon terminal e reto, que pode ser ajudada pela prensa abdominal. A distensão do cólon terminal e reto é o estímulo normal para o reflexo, que inclui movimentos peristálticos do cólon terminal, contração do músculo longitudinal do reto e relaxamento dos esfíncteres anais interno e externo (10). Lesões dos esfíncteres impossibilitam seu relaxamento e expulsão das fezes, que tendem a se acumular nas porções terminais do cólon menor e reto, levando à absorção de água do conteúdo e culminando em ressecamento e compactação (2). Desse modo, os achados clínicos notados após o ato cirúrgico, são coerentes, uma vez que possíveis danos iatrogênicos, comprometendo musculatura e terminações nervosas, ocasionaram inflamação do reto e ânus, promovendo disfunção transitória da defecação (2, 4 e 7).

A terapêutica adotada no pós-operatório mostrou-se pertinente, pois evitou o agravamento do quadro de cólica (2, 5). Optou-se pela utilização da dipirona sódica por essa exercer efeito analgésico e antiinflamatório por inibir potencialmente os nociceptores, tendo este fármaco menor efeito sobre a COX-1 (11). A deiscência da ferida, conduziu o tratamento

da ferida para segunda intenção, com higienização e curativos com iodo povidine (12, 13). A defecação normal retornou por volta do 30º dia pós-cirúrgico e seus parâmetros clínicos não apresentaram alterações neste período. A ferida cicatrizou após 25 dias com restabelecimento dos aspectos anatômicos e fisiológicos do ânus.

A retenção reflexa das fezes, determinando quadro clínico de cólica intermitente, ocorreu em virtude do processo inflamatório pós-operatório que proporcionou disfunção transitória do reto e ânus. As alterações mostraram-se reversíveis e as condutas terapêuticas adotadas foram corretas, estando o paciente com restabelecimento à normalidade das características anatômicas e fisiológicas do ânus.

## REFERÊNCIAS

1. Scott DW, Miller WHJ. Dermatologia equina. Buenos Aires: Inter-Médica; 2004.
2. Thomassian A. Enfermidades dos cavalos. 4ª ed. São Paulo: Varela; 2005.
3. Brinsko SP. Neoplasia of the male reproductive tract. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1998;14(3):517-25.
4. Tudury EA, Potier GMDA. Tratado de técnica cirúrgica veterinária. São Paulo: MedVet; 2009.
5. Smith BP. Tratado de medicina interna de grandes animais. São Paulo: Manole; v.2, 1993.
6. Ferreira C, Palhares MS, Melo UP, Gheller VA, Braga CE. Cólicas por compactação em equinos: etiopatogenia, diagnóstico e tratamento. *Acta Vet Bras.* 2009;3(3):117-26.
7. Silva GB. Injeção peridural de lidocaína associada à xilazina ou detomidina na prevenção da dor pós-incisional em éguas [dissertação]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2009.
8. Goldschmidt MH, Hendrick MJ. Tumors of the skin and soft tissues. In: Meuten DJ, editor. *Tumors in domestic animals.* 4ª ed. Ames: Iowa State Press; 2002. p.45-118.
9. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Dermatologia de pequenos animais. 5ª ed. Rio de Janeiro: Interlivros; 1996.
10. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. Skin diseases of the dog and cat clinical and histopathologic diagnosis. 2ª ed. Ames: Blackwell Science; 2005.
11. Reis FJ, Rocha NP. Efeito analgésico de longa duração da dipirona sobre a hiperalgesia persistente induzida pela constrição do nervo ciático em ratos: participação do óxido nítrico. *Rev Bras Cienc Farm.* 2006;42(4):513-22.
12. Swenson MJ, Reece WO. Dukes: fisiologia dos animais domésticos. 11ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 1996.
13. Stashak TS. Equine wound management. London: Lea & Febiger; 1991.

**Recebido em: 24/05/12**

**Aceito em: 14/11/12**

**PARASITISM BY *Dioctophyme renale* (GOEZE, 1782) IN MANED WOLF (*Chrysocyon brachyurus*), BRAZIL**

Janaina Duarte<sup>1</sup>  
Adriana Miranda Bezerra Costa<sup>1</sup>  
Satie Katagiri<sup>2</sup>  
Jéssica Amancio Martins<sup>1</sup>  
Maria Elena Oliveira<sup>1</sup>  
Claudia Mello Ribeiro<sup>1</sup>

**ABSTRACT**

This paper reports a case of parasitism by *Dioctophyme renale* in a maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) found in *rigor mortis* in São Paulo State. The wolf was subjected to necropsy which indicated that its right kidney was parasitized by three *D. renale* specimens: one female, one male and one larva. The right kidney was atrophied and had bloody content. In such bloody content, there were eggs showing morphology characteristic of *D. renale*. The left kidney was hypertrophied. On account of its predatory action, *D. renale* can reduce the survival of maned wolves in their natural habitat.

**Keywords:** *Dioctophyme renale*, *Chrysocyon brachyurus*, dioctophymosis, renal hypertrophy

**PARASITISMO POR *Dioctophyme renale* (GOEZE, 1782) EM LOBO-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*), BRASIL**

**RESUMO**

Este artigo relata um caso de parasitismo por *Dioctophyme renale* em um lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), encontrado em *rigor mortis* no Estado de São Paulo. O animal foi necropsiado, e o rim direito estava parasitado por três exemplares de *D. renale*: uma fêmea, um macho e uma larva. O rim direito encontrava-se atrofiado e continha conteúdo sanguinolento. Nesse conteúdo sanguinolento foram encontrados ovos com morfologia característica de *D. renale*. O rim esquerdo estava hipertrofiado. Devido a sua ação espoliadora, *D. renale* pode diminuir a sobrevivência dos lobos-guarás em seu habitat natural.

**Palavras-chave:** *Dioctophyme renale*, *Chrysocyon brachyurus*, dioctofimose, hipertrofia renal.

**PARASITISMO POR *Dioctophyme renale* (GOEZE, 1782) EN UN LOBO COLORADO (*Chrysocyon brachyurus*), BRASIL**

**RESUMEN**

En este trabajo se reporta un caso de parasitismo por *Dioctophyme renale* en un lobo colorado (*Chrysocyon brachyurus*), encontrado en *rigor mortis* en el estado de São Paulo. El animal fue sometido a necropsia y fueron encontrados una hembra, un macho y una larva de *D. renale* en el riñón derecho, así como atrofia del mismo órgano y contenido sanguinolento. En ese contenido fueron encontrados huevos con características morfológicas de *D. renale*. Se

<sup>1</sup> Universidade Paulista

<sup>2</sup> Universidade Federal de Sergipe

observó también hipertrofia del riñón izquierdo. Debido a la naturaleza de su ciclo biológico *D. renale* puede disminuir el tiempo de vida del lobo colorado en su hábitat natural.

**Palabras clave:** *Dioctophyme renale*, *Chrysocyon brachyurus*, dioctofimosis, hipertrofia renal.

## INTRODUCTION

*Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) is known as giant kidney worm since it is frequently found in the renal pelvis of the definitive host and can be up to 100 cm long, the largest nematode described in mammals. In the evolutionary cycle of *D. renale*, the intermediate host is an aquatic oligochaete of the genus *Lumbriculus* which ingests eggs containing the first-instar larva of the parasite, while the definitive host is infected by ingesting water containing the oligochaete, or the paratenic host which can be a fish or an amphibian (1).

Parasitism by *D. renale* has been frequently reported in dogs (2), but this parasite has also been found in wild animals all around the world. *D. renale* was already described in gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*) from Mexico (3), american marten (*Martes americana*) and mink (*Mustela vison*) from the United States (4, 5). In Brazil, *D. renale* was found in bush dog (*Speothos venaticus*) (6), southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*) (7), crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) (8) and maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) (9). Additionally, there are sporadic reports in other mammals as atypical definitive hosts, such as cattle, horses, swine. Regarding humans infections, *D. renale* is a zoonotic or public health concern, since unequivocal cases in human beings have been documented (10).

The maned wolf is a wild canid found in cerrado areas or in open fields in Brazil. A large number of these animals host parasites such as *D. renale*, *Dipylidium* spp., *Toxocara* spp., *Ancylostoma caninum*, *Uncinaria* spp., *Trichuris* spp., *Capillaria* spp. and coccidia which may lead to death due to stressing situations. Although scarce, epidemiological studies of wild canids have cited that parasitic diseases can be the first causes of maned wolf mortality (11).

## CASE REPORT

In this paper, a case of a maned wolf parasitized by *D. renale* is reported. In August 2011, a young male maned wolf was found dead and in *rigor mortis* in a road at Pindamonhangaba Municipality, São Paulo, Brazil (22° 55' 26" S, 45° 27' 43" W). During necropsy, intense epistaxis, oral cavity bleeding, hemothorax and hemoperitoneum were observed, suggesting that the cause of death of this maned wolf was traumatism, probably due to road killing. In the stomach, several rats and *Diptera* larvae were found partially digested. Those larvae were also seen in the small intestine of this animal. The right kidney showed renal parenchyma atrophy (Figure 1), bloody content and three *D. renale* specimens: one female, one male and one larva (Figure 2). The bloody content present in the kidney was analyzed under an optical microscope. The identified eggs were bioperculate, elliptical, brown and had a thick layer, characteristic of *D. renale*. The left kidney was hypertrophied (Figure 3). The urethra and the bladder did not show macroscopic lesions.

*D. renale* is frequently described in brazilian dogs in comparison to other countries suggesting that the disease is more prevalent in this country, where the diversified tropical ecosystems may facilitate the harmonious coexistence (and adaptation) of the intermediate, paratenic and/or accidental hosts of this parasite thereby increasing the chances of infection and diagnosis (10). Maybe it can be extrapolate to wild animals.



Figure 1. Right kidney of maned wolf parasitized by *D. renale*



Figure 2. *D. renale* specimens present in the right kidney of the maned wolf

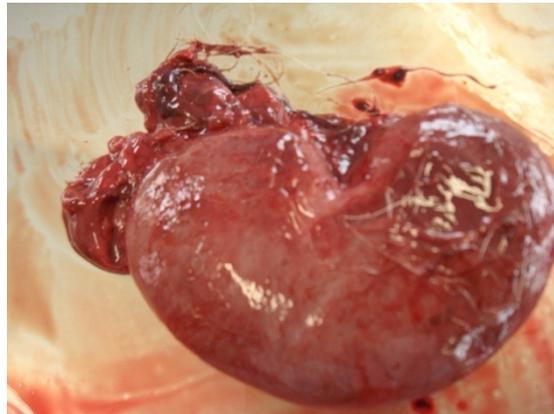


Figure 3. Left kidney of the maned wolf with hypertrophy

Diagnosis of dioctophymosis in dogs is made by means of *D. renale* egg search in the urine or imaging techniques such as radiography and ultrasonography (12). For wild animals, however, parasitism by *D. renale* is generally diagnosed during *post-mortem* inspection. In canids, this parasite is usually found in the right kidney due to its proximity to the duodenum and can cause renal atrophy, pelvis dilation, fibrosis, urethral obstruction, chronic inflammation or even total destruction of the renal parenchyma. In addition, *D. renale* can migrate to the abdominal cavity. In dogs, clinical signs are not specific and may include pain,

fever, prostration, hematuria, pyuria, reluctance to walk, increased frequency of urination, anorexia, convulsions, anemia, ascites, renal and abdominal colic, weight loss, irritability, polydipsia, proteinuria and uremia (2, 10). Considering maned wolves, there is lack of studies of the pathological and clinical aspects of parasitism by *D. renale*. Parasitism by *D. renale* in maned wolves is diagnosed during the capturing of such animals, and a large number of them do not show clinical signs of diotophymosis at that moment. Nevertheless, intense deterioration caused by *D. renale* may lead this parasite to reduce the survival of maned wolves in their natural habitat, acting in the population control and helping maintain the genetic variability of these animals.

The presence of *D. renale* in maned wolves is related to the ingestion of water containing the oligochaete or to the ingestion of the paratenic host, a fish or an amphibian, containing the third-instar larva of *D. renale*. In Brazil, there are a few studies of the feeding habits of maned wolves. On the other hand, studies based on the observation of these animals, in the wild, have reported that their diet is constituted especially of fruits such as wolf apple (*Solanum lycocarpum*) and small mammals or armadillos as the main sources of animal protein. Birds, reptiles and medium- and large-size vertebrates are also found in the diet of this species (13). Bueno, Belentani and Motta-Junior (14) were the only investigators to report fish and amphibians in the diet of this animal, but always at very low proportions. Thus, further studies of the diet of these animals are needed since they may be consuming fish infected by *D. renale*.

This paper reports parasitism by *D. renale* in a maned wolf (*C. brachyurus*) and suggests the implantation of measures to monitor parasitic load in this species, since the parasites may lead to a decline in the population contingent of these animals.

## REFERENCES

1. Freitas MG. Helminthologia veterinária. Belo Horizonte: Rabelo; 1980.
2. Ferreira VL, Medeiros FP, July JR, Raso TF. *Diocotophyma renale* in a dog: clinical diagnosis and surgical treatment. *Vet Parasitol.* 2010;168:151-5.
3. Hernández-Camacho N, Pineda-López R, López-González CA, Jones RW. Nematodes parasites of the gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*, Schreber, 1775) in the seasonally dry tropical highlands of central Mexico. *Parasitol Res.* 2011;108:1425-9.
4. Dyer NW. *Diocotophyma renale* in ranch mink. *J Vet Diagn Invest.* 1998;10:111-3.
5. Seville RS, Addison EM. Nongastrointestinal helminths in marten (*Martes americana*) from Ontario, Canada. *J Wildl Dis.* 1995;31:529-33.
6. Proença C. Sobre dois casos de *Diocotophyme renale* em cão no Rio de Janeiro. *Bol Vet Exerc.* 1935;2:50-1.
7. Rocha UF, Serra RG, Grechi R. Parasitismo por *Diocotophyma renale* (Goeze, 1782) em “preguiça” *Choloepus didactylus*, Linnaeus, 1758. *Rev Farm Bioquim Univ Sao Paulo.* 1965;3:325-34.
8. Ribeiro CT, Verocai GG, Tavares LE. *Diocotophyme renale* (Nematoda, Diocotophymatidae) infection in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Brazil. *J Wildl Dis.* 2009;45:248-50.

9. Giovannoni M, Molfi A. O *Diocetophyma renale* (Goeze, 1782) no Brasil. In: Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná; 1960, Curitiba. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 1960. p.99-104.
10. Nakagawa TL, Bracarense AP, Dos Reis AC, Yamamura MH, Headley SA. Giant kidney worm (*Diocetophyma renale*) infections in dogs from Northern Paraná, Brazil. *Vet Parasitol.* 2007;145:366-70.
11. Maia OB, Gouveia, AMG. Birth and mortality of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) in captivity. *Braz J Biol.* 2002;62:25-32.
12. Zardo KM, Santos DR, Babicsak VR, Belotta AF, Oliveira HS, Estanislau CA, et al. Aspecto ultrassonográfico da diocetofimose renal canina. *Vet Zootec.* 2012;19:57-60.
13. Santos EF, Setz EZF, Gobbi N. Diet of maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and its role in seed dispersal on a cattle ranch in Brazil. *J Zool.* 2003;260:203-8.
14. Bueno AA, Belentani SCS, Motta-Junior JC. Feeding ecology of the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) (Mammalia: Canidae), in the Ecological Station of Itirapina, São Paulo State, Brazil. *Biota Neotrop.* 2002;2:1-9.

**Recebido em: 14/06/12**

**Aceito em: 06/12/12**

## APRESENTAÇÃO ATÍPICA DE TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CUTÂNEO EM UM CÃO

Tiago Barbalho Lima<sup>1</sup>

Paulo Vinícius Tertuliano Marinho<sup>2</sup>

Raphael Nikolas Lira<sup>3</sup>

Paulo César Jark<sup>4</sup>

Jairo Ferreira Passino Melo<sup>5</sup>

Luiz Carlos Rêgo Oliveira<sup>6</sup>

### RESUMO

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) é uma neoplasia frequentemente localizada em região genital, embora possa ser encontrada em outros sítios como lesão única. O presente trabalho relata o acometimento de um cão por TVT em localização extragenital (lesão cutânea em membro pélvico direito) e com aspectos atípicos (lesão ulcerada com tecido de granulação exuberante) como lesão única. A mesma foi tratada com sulfato de vincristina, verificando-se total regressão tumoral com apenas três aplicações.

**Palavras-chave:** TVT extragenital, úlcera, lesão única, sulfato de vincristina.

## CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR IN A DOG WITH SINGLE EXTRAGENITAL LOCATION

### ABSTRACT

The Transmissible Venereal Tumor (TVT) is a neoplasm often located in the genital region, although it can be found on other sites as a single lesion. This work reports the involvement of a dog for TVT in an extragenital location (right hind limb) and atypical appearance (ulcerated lesion with exuberant granulation tissue) as a single lesion. The same was treated with vincristine sulfate, verifying total tumor regression with only three applications.

**Keywords:** extragenital TVT, ulcer, single lesion, vincristine sulfate.

## LOCALIZACIÓN CUTÁNEA DE TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE EN UN PERRO

### RESUMEN

El tumor venéreo transmisible (TVT) es una neoplasia que se encuentra comúnmente en la región genital, aunque se pueden encontrar en otros sitios como una lesión única. Este trabajo reporta la presencia de TVT extragenital (lesión cutánea en el miembro torácico derecho) con aspecto atípico (ulceración con tejido de granulación exuberante) como una lesión única. El tumor fue tratado con éxito (regresión total) con tres aplicaciones de sulfato de vincristina.

**Palabras clave:** extragenital, TVT, úlcera, lesión única, sulfato de vincristina.

<sup>1</sup> Médico Veterinário formado pela Universidade Estadual do Maranhão. Atualmente é mestrando do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da UNESP - Jaboticabal, SP. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

<sup>2</sup> Residente em Cirurgia de Pequenos Animais, Unesp Jaboticabal, SP

<sup>3</sup> Médico Veterinário autônomo. Atualmente trabalha na área de Clínica Médica e Cirúrgica de pequenos animais

<sup>4</sup> Médico Veterinário formado pela UDESC. Atualmente é mestrando no programa de pós-graduação em Clínica Médica da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, SP

<sup>5</sup> Médico Veterinário autônomo, formado pela Universidade Estadual do Maranhão

<sup>6</sup> Professor Dr do Departamento das Clínicas (CCA), UEMA

## INTRODUÇÃO

O Tumor Venéreo Transmissível (TVT) é uma neoplasia contagiosa que, em condições naturais acomete somente caninos (1). Sticker (2) constatou que essa neoplasia é transmissível por células transplantáveis, com localização predominantemente venérea, afetando o pênis e a vagina de cães, mas também podendo ser encontrado em regiões extragenitais (3).

Como método diagnóstico pode-se usar a impressão sobre lâmina de microscopia (imprint) e citologia aspirativa com agulha fina, sendo estes de simples e rápida execução, além de baixo custo (4). Pela avaliação citológica o TVT pode ser classificado em três tipos distintos: plasmocitóide, linfocitóide e misto, sendo o plasmocitóide associado a maior quimiorresistência (5).

Várias condutas terapêuticas vêm sendo preconizadas para o TVT, dentre elas a mais utilizada é a quimioterapia antineoplásica (6, 7) a base de sulfato de vincristina.

O objetivo do presente trabalho é relatar um caso de TVT de localização extragenital como lesão cutânea única e atípica em um cão, abordando o diagnóstico, tratamento e resultados obtidos.

## RELATO DE CASO

Foi atendida no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Maranhão, uma cadela sem raça definida, de aproximadamente 3 anos, pelagem dourada, 13 Kg, apresentando lesão de caráter arredondado, ulcerada e com bordos espessados, associados à inflamação (tecido de granulação exuberante) da região do membro pélvico direito, medialmente, na altura da articulação tíbio-társica (Figura 1). A mesma foi encontrada na rua e desconhecia-se seu histórico anterior. Ao exame físico, verificou-se bom estado geral, ausência de claudicação e dor no membro afetado. Não foram verificadas lesões características de TVT em vulva ou vagina durante a realização do exame físico

A princípio, a lesão foi tratada localmente utilizando-se limpeza com solução fisiológica seguido da aplicação de pomada antimicrobiana à base de nitrofurazona. Com o insucesso da terapia, buscou-se investigação de diagnósticos diferenciais.



Figura 1. Lesão no membro posterior próximo a articulação tíbio-társica, ulcerada e com bordas espessadas, associada à inflamação.

Foi realizado punção biópsia aspirativa com agulha (PBAA) fina e imprints do local, que revelaram presença de células neoplásicas, com citoplasma abundante, grande quantidade de vacúolos e núcleo excêntrico, compatíveis com TVT plasmocitóide (Figura 3).

Adotou-se tratamento a base de sulfato de vincristina, na dose de  $0,7/m^2$ , a cada 7 dias, num total de três aplicações. Observou-se rápida resposta com notável regressão, diminuição da inflamação e produção de tecido cicatricial nos bordos da ferida logo na primeira semana (Figura 2A). A evolução do quadro clínico continuou com regressão total da lesão em um prazo de 4 semanas (Figura 2D).



Figura 2. Evolução da lesão durante e após o tratamento. A: 1ª semana de quimioterapia. B: 2ª semana. C: 3ª semana. D: 4ª semana demonstrando regressão total.

Foi solicitado ultrassonografia abdominal em que não foram verificadas lesões ou alterações metastáticas. Concomitantemente ao tratamento, foram realizadas coletas de sangue para análises hematológicas, bioquímicas (ALT, creatinina), com objetivo de avaliar possíveis alterações hematológicas e sistêmicas induzidas pelo quimioterápico. A partir da segunda semana, observou-se somente elevação discreta das dosagens bioquímicas de ALT.

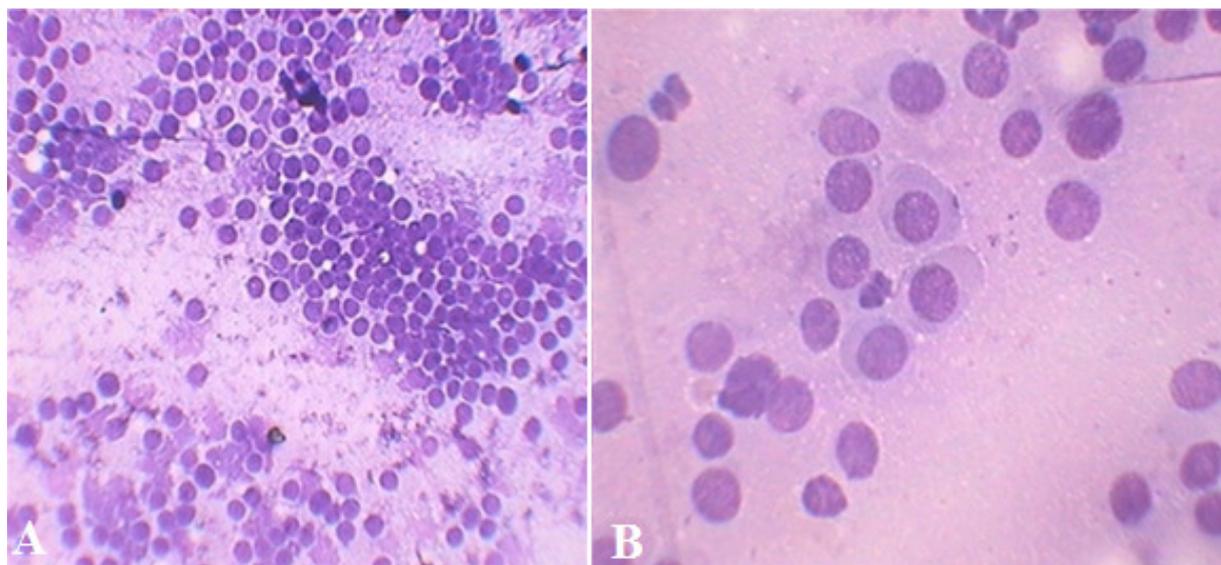


Figura 3. Células neoplásicas do grupo de tumores de células redondas encontradas na PBAA realizada no local de lesão. Aumento de 400x (A) e 1000x (B).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O TVT também pode se desenvolver em sítios extragenitais, como por exemplo, mucosa nasal ou oral (8, 9). Mais raramente, podem ser encontrados em outras áreas, incluindo gordura e peritônio, ou em órgãos como tonsilas, olhos, fígado, baço, rim, pulmão e musculatura (10-12). Há relato de um caso intraocular primário deste tumor (13). O TVT cutâneo tem aparência variável, porém a maioria dos cães apresenta lesão proliferativa verrucosa, ou com nódulos únicos ou disseminados e superfície ulcerada e friável (14). Lesões ulcerativas e de bordo espessado em pele foram relatadas por Santos et al. (15), em um poodle, embora o mesmo apresentasse lesão primária vaginal e possível metástase em baço.

A transmissão do TVT cutâneo geralmente ocorre devido ao hábito de socialização dos animais em lambar e morder que facilita a implantação das células neoplásicas ou pode ocorrer na forma de metástase de TVT genitais (16). Pelo fato do animal não apresentar sinais genitais da doença, sugere-se a primeira hipótese como causa da transmissão.

Flórez et al. (5) classificam os TVTs em três tipos citomorfológicos: o plasmocitóide que apresenta uma quantidade superior a 60% de células com citoplasma amplo, núcleos excêntricos e grande quantidade de vacúolos; linfocitóide caracterizado por uma quantidade superior a 60% de células redondas com citoplasma finamente granular, núcleo central e pouca quantidade de vacúolos intracitoplasmáticos e o misto que apresenta células plasmocitóides e linfocitóides sendo que nenhuma delas predomina em mais de 60% das células. O animal do presente relato apresentou a forma plasmocitóide do TVT, que segundo os autores está associado a maior quimiorresistência, devido ao aumento da expressão de glicoproteína P, que age no efluxo de alguns quimioterápicos como vincristina e doxorrubicina favorecendo a quimiorresistência (5).

Embora o TVT apresentado pelo animal seja plasmocitóide o mesmo respondeu favoravelmente a quimioterapia a base de sulfato de vincristina por via endovenosa apresentando regressão do tecido tumoral após a segunda administração do quimioterápico e regressão completa após 4 semanas, em um total de 3 aplicações. Este resultado corrobora com Olgivie (17) que constatou cura em 90% dos cães com TVT após 3 aplicações de sulfato de vincristina. Em outro estudo Silva et al. (6) observaram que 80% dos cães obtiveram cura somente após a 5ª aplicação.

Embora a forma mais comum de TVT cutâneo seja lesões verrucosas ou nodulares ulcerativas, deve-se suspeitar de TVT nos casos de lesões cutâneas de formação ulcerativa e exuberante de tecido de granulação como lesão única. Apesar da apresentação plasmocitóide estar associado a maior quimiorresistência o animal do presente relato respondeu favoravelmente a quimioterapia empregada, necessitando apenas de três aplicações para completa remissão do quadro.

## REFERÊNCIAS

1. Rogers KS. Transmissible venereal tumor. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1997;19:1036-45.
2. Sticker A. Transplantables Lymphosarkom des Hundes. *Z Krebsforsch.* 1904;1:413-44.
3. Chiti L, Amber EI. Incidence of tumors seen at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zambia: a four year retrospective study. *Zimbabwe Vet J.* 1992;3:143-7.
4. Lorimier LP, Fan TM. Canine transmissible venereal tumor. In: Withrow SJ, Vail DM. *Small animal clinical oncology.* New York: WB Saunders; 2007. cap.32, p.799-804.

5. Flórez MM, Pedraza F, Grandi F, Rocha NS. Cytologic subtypes of canine transmissible venereal tumor. *Vet Clin Pathol*. 2012;41:4-5.
6. Silva MCV, Barbosa RR, Santos RC, Chagas RSN, Costa WP. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no hospital veterinário da UFERSA. *Acta Vet Bras*. 2007;1:28-32.
7. Spugnini EP, Dotsinsky I, Mudrov N, Citro G, D'Avino A, Baldi A. Biphasic pulses enhance bleomycin efficacy in a spontaneous canine genital tumor model of chemoresistance: Sticker sarcoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2008;27:58.
8. Gurel A, Kuscu B, Gulanber EG, Arun SS. Transmissible venereal tumors detected in the extragenital organs of dogs. *Israel J Vet Med*. 2002;57:23-6.
9. Filgueira KD. Tumor venéreo transmissível canino com localização primária e única em cavidade oral. *Acta Sci Vet*. 2010;38:91-4.
10. Oduye OO, Ikede BO, Esuruoso GO, Akpokodje JU. Metastatic transmissible venereal tumor in dogs. *J Small Anim Pract*. 1973;14:625-37.
11. Rogers KS, Walker MA, Dillon HB. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1998;34:463-70.
12. Mukaratirwa S, Gruys E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *Vet Q*. 2003;25:101-11.
13. Rodrigues GN, Alessi AC, Laus JL. Intraocular transmissible venereal tumor in a dog. *Cienc Rural*. 2001;31:141-3.
14. Goldschmidt MH, Hendrick MJ. Tumors of the skin and soft tissues. In: Meuten DJ. *Tumors in domestic animals*. Iowa: Iowa State Press; 2002. p.45-117.
15. Santos JP, Barbosa MAG, Tenório APM, Coelho MCOC, Rolim MBQ, Tudury EA. Tumor venéreo transmissível em um canino com acometimento de pele. *Med Vet*. 2008;2:39-43.
16. Das U, Das AK. Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Vet Res Commun*. 2000;24:545-56.
17. Olgivie GK. Chemotherapy. In: Withrow JS, MacEwen EG. *Small animal clinical oncology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1996. p.70.

**Recebido em: 10/05/12**

**Aceito em: 13/12/12**

## **CANDIDA PARAPSILOSIS AS VERO CELL CULTURE CONTAMINANT IN NEOSPORA CANINUM ANTIGEN PRODUCTION**

Raíssa Vasconcelos Cavalcante<sup>1</sup>  
Mariana Kikuti<sup>1</sup>  
Virginia Bodelão Richini-Pereira<sup>1</sup>  
Helio Langoni<sup>1</sup>

### **ABSTRACT**

*Neospora caninum* has been identified as an important cause of infectious in cattle and dogs. The parasite is successfully established in continuous passage in VERO cell cultures. Cell culture contamination may present itself in two mainly forms: contamination with other cell line or with microorganisms. In this paper we report a VERO cell culture of *Neospora caninum* antigen production contaminated with *Candida parapsilosis*. Sequencing of the ITS amplicons showed 99% similarity with deposited sequences of *Candida parapsilosis* at GenBank. It should be noted through this report the possibility of contamination by *Candida parapsilosis* in cell cultures, thus care in handling cultures should be redoubled.

**Keywords:** *Neospora*, VERO cells, *Candida*, cell culture contamination

## **CANDIDA PARAPSILOSIS COMO CONTAMINANTE DE CULTURA DE CÉLULAS VERO NA PRODUÇÃO DE ANTÍGENO DE NEOSPORA CANINUM**

### **RESUMO**

*Neospora caninum* tem sido identificado como um importante agente causador de infecções em bovinos e caninos. O parasita é mantido com sucesso em passagens contínuas em culturas de células VERO. A contaminação de culturas células pode ocorrer de duas formas principais: contaminação com outras linhagens celulares ou com micro-organismos. Neste trabalho, relata-se uma cultura de células VERO para produção de antígeno de *Neospora caninum* contaminada com *Candida parapsilosis*. O sequenciamento dos amplicons da região ITS apresentou 99% de similaridade com *Candida parapsilosis* nas sequências depositadas no GenBank. Ressalta-se através deste relato a possibilidade de contaminação por *Candida parapsilosis* em cultivos celulares, devendo-se redobrar os cuidados na manipulação.

**Palavras-chave:** *Neospora*, células VERO, *Candida*, contaminação de culturas celulares

## **CANDIDA PARAPSILOSIS COMO CONTAMINANTE DE CULTIVOS CELULARES VERO EN LA PRODUCCIÓN DE NEOSPORA CANINUM ANTIGEN**

### **RESUMEN**

*Neospora caninum* ha sido identificado como un importante agente causador de infecciones en bovinos y caninos. Este parásito es mantenido con éxito en cultivos celulares VERO. La contaminación de los cultivos celulares puede ocurrir de dos formas principales: la contaminación con otras líneas celulares o con microorganismos. Este trabajo relata un cultivo de células VERO para la producción de antígeno de *Neospora caninum* contaminada con *Candida parapsilosis*. La secuenciación de los amplicones de la región ITS presentó 99% de similitud con las secuencias de *Candida parapsilosis* depositadas en GenBank. Se destaca en

<sup>1</sup> Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu

esta comunicación la posibilidad de contaminación de los cultivos celulares por *Candida parapsilosis* y, por lo tanto, la importancia de redoblar los cuidados en la manipulación de estos.

**Palabras clave:** *Neospora*, células VERO, *Candida*, contaminación de cultivos celulares

*Neospora caninum* is a parasite discovered and described in 1984 and 1988, respectively and affects mainly cattle and dogs. It is traditionally maintained in laboratories in cell cultures for antigen production for serologic diagnosis by indirect immunofluorescence technique (1).

Since cell culture production consists of a aseptic environment, its maintenance depends on physical and chemical controls to prevent contamination. Cell culture contamination may present itself in two mainly forms: contamination with other cell line or with microorganisms. In the second form, contamination may arise from the operator or from laboratory environment, such as media, serum, poor aseptic technique and airborne contamination. Microbial contamination agents are mycoplasma, bacteria, fungi, yeasts and viruses, being mycoplasma the most common agent reported in cell culture contaminations (2,3).

In this paper we report a VERO cell culture of *Neospora caninum* antigen production contaminated with *Candida parapsilosis*. The genus *Candida* is characterized by globose, ellipsoidal, cylindroidal or elongate cells with holoblastic budding reproduction and the ability of form pseudohyphae (4). *Candida* is considered the most important saprophytic opportunistic mycoses reported causing oral, gynecological and dermatological disease (9, 10). It affects mainly patients in intensive care units, with cancer, undergoing surgical procedures and neonates (5).

The species *C. parapsilosis* was described by Langeron and Talice in 1932 (12). It is the second leading agent of candidemia in Latin America and it is distributed through all ages, including neonates. *C. parapsilosis* cluster in the northern hemisphere, and associated with lower mortality rates (5).

The NC-1 strain of *Neospora caninum* is maintained in Vero cell culture in the Zoonosis Diagnostic Laboratory (FMVZ-UNESP/Botucatu) for production of antigens for Indirect Immunofluorescence (IIF), used in routine and surveys diagnostic in the laboratory.

Vero cells are grown in sterile and disposable polystyrene bottles of 25 cm<sup>2</sup>. The culture is maintained with 6 ml of RPMI 1640 medium supplemented with 10% of inactivated and sterile fetal bovine serum (FBS) and added 1% of antibiotic-antimycotic solution containing streptomycin, penicillin and amphotericin B (Invitrogen Cat. n. 15240-096). It is incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and with humidity control, favoring cell growth.

The cell monolayer is generated from growth and confluence of cell being dispersed, in order to obtain cells free to chime in new bottles with the aid of the enzyme trypsin. After the establishment of the monolayer, which occurs after 48 hours of incubation, the bottles are inoculated with 500 µL of suspension of tachyzoites of *N. caninum* NC-1 strain. In four days, formation and disruption of the cysts occurs. For the production of antigen through the infection of cell it is used medium without addition of FBS. The inverted microscope "Leica MS60" and magnification of 400X is used to observe the growth of cell and parasites.

Before and after handling the bottles, a strict aseptic protocol is carried out using 10% sodium hypochlorite solution, 70% ethanol and UV light for 20 minutes around the material to be used such as bottles of medium and trypsin, pipettes, automatic pipettor, disposal container, gloves and gauze.

In an attempt to reduce the risk of contamination between bottles of *N. caninum* tachyzoites inoculated and cells bottles, the bottles inoculated with tachyzoites are handled before the bottles containing only cell culture.

It was first observed in a cell culture bottle uninoculated with tachyzoites, the presence of oval to spherical structures, individually or grouped in clusters, which does not destroy the cell monolayer. The bottle that was contaminated was discarded and reinforced the procedures of antisepsis and asepsis.

Then, two bottles were presented contaminated with the same structure and were selected to perform microbiological examination, along with aliquots of the means used (RPMI enriched with antibiotics-antimycotics with and without FBS, fetal bovine serum and trypsin. These samples were plated on blood agar and incubated in a bacteriological incubator at 37°C, with evaluation for 72 hours. In 48 hours, there was growth of small colonies round, shiny, smooth and creamy from the contaminated cell culture. Gram staining was performed in which yeast-like organisms were observed, gram-positive cells presenting as varying from globose to elongated, thin-walled features of *Candida* spp.. The samples were sent for molecular detection. To control contamination, culture media, trypsin and FBS were discarded and replaced with new sterile jars, despite the negative result in the blood agar. The cleaning procedures for the room and the sterile laminar flow were reinforced and contaminated bottles were discarded, obtaining good results in controlling contamination.

The DNA extraction from *Candida* spp. was performed according to Van Burik et al. (6) using the Kit Illustra Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin® (GE Healthcare, USA). The amplification was carried out by PCR reactions, using as primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG-3') that amplified 634 bp as described by White et al. (7). The process was performed in 25 µL containing 1X PCR buffer (10 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 10 µmol of each primer, 10 ng of purified DNA and 0.2 U.µL<sup>-1</sup> of Platinum Taq DNA polymerase system (Invitrogen, Brazil). Thermal cycling conditions were 94°C for 5 min, followed by 25 cycles at 94°C for 1 min, at 60°C for 2 min and 72°C for 2min and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were identified by agarose gel electrophoresis. Amplicons were purified by employing ExoSap (USB, USA). Using the sequencer 3500 Genetic Analyser (Life Technologies, USA), reactions was carried out in both strands according to DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare). The obtained sense and antisense sequences were visualized (Chromas 2.3 software, Technelysium Pty Ltd, Australia), aligned by the MEGA 4 software and compared with the NCBI database using BLASTn (Basic Local Alignment Tool for Nucleotide).

The molecular identities of these amplicons were confirmed by sequencing showing 99% similarity with *Candida parapsilosis* DNA sequence deposited at Gen Bank (gbIHQ263346.1).

Although some authors have reported contamination with yeast, the data in the literature are scarce (8). It remains unknown the source of the contamination described. The commercial culture media used, trypsin, bovine sera, the technical staff responsible for the ringing of the cultures, as well as the aerosol formed during trypsinization of bottles of contaminated cell cultures can be sources of contamination, although in this case growth of the agent was not observed in the mediums used.

The medium used for cultures maintenance was increased by the antifungal amphotericin B in order to reduce the risk of fungal contamination. However, it is recommended to control yeast and especially *C. parapsilosis*, the use of ketoconazole and itraconazole (8). In addition, there is controversy about the use of antibiotics, as some authors argue that these may lead to aseptic technique failure in addition to inhibiting some processes of eukaryotic cells and hide the presence of microbial contamination, since, without the use of antibiotics, they shall become apparent as soon as possible, and indicates that culture should be discarded before spreading contamination to other bottles or that one should try to decontamination. The decontamination should be done only as a last resort, since it is not always successful and can lead to the development of antibiotic resistance (9, 10).

Another important source of contamination is the people who handle the cell cultures, so the main contaminants will be the microorganisms present in human skin flora. It is known that *C. parapsilosis* is typically a commensal of human skin and its pathogenicity is limited by intact skin (5).

In a study, it was observed that most opportunistic pathogenic microorganisms were human recovered, which are inhabitants of healthy skin, throat, mucous membranes and are also found in the environment. People disperse hundreds to thousands of organisms per minute in the air. So, these microorganisms can travel through the air and be deposited in cell cultures and later produce contamination (10).

The culture media and reagents, such as trypsin and fetal bovine serum were exchanged, and the care of the manipulator with cleaning materials and equipment used and the maintenance of cell cultures have been strengthened.

It should be noted through this report the possibility of contamination by *Candida parapsilosis* in cell cultures, thus care in handling cultures should be redoubled.

## REFERENCES

1. Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol.* 2003;41:1-16.
2. Lincoln CK, Gabridge MG. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. *Methods Cell Biol.* 1998;57:49-65.
3. Langdon SP. Cell culture contamination: an overview. In: *Cell culture: methods and protocols.* 2nd ed. New Jersey: Humana Press; 2011. p.309-17.
4. Lodder J. *The yeasts: a taxonomic study.* 2nd ed. Amsterdam: North Holland; 1970.
5. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2010;51:561-70.
6. Van Burik JAH, Schreckise RW, White TC, Bowden RA, Myerson D. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med Mycol.* 1998;36:299-303.
7. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* San Diego: Academic Press; 1990. p.315-22.
8. Behrens UJ, Paronetto F. Elimination of the yeast *Candida parapsilosis* from lymphoid cells and monolayer cells in culture. *In Vitro.* 1994;20:391-5.
9. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications.* 6th ed. New York: John Wiley & Sons; 2010.
10. Cobo F, Cortes JL, Cabrera C, Nieto A, Concha A. Microbiological contamination in stem cell cultures. *Cell Biol Int.* 2007;31:991-5.

**Recebido em: 05/06/12**

**Aceito em: 18/10/12**

## AUSÊNCIA DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS PARA *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM AMOSTRAS DE AMBIENTES AVÍCOLAS NO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

Guilherme Augusto Marietto Gonçalves<sup>1</sup>  
Bianca Yuri Borges Suehiro<sup>1</sup>  
Keila Carolina de Ornellas Garcia Dutka<sup>2</sup>  
Luis Felipe Zuccolo Paschoal da Costa<sup>2</sup>  
Raphael Lucio Andreatti Filho<sup>1</sup>

### RESUMO

Avaliou-se a presença de bacteriófagos líticos para *Salmonella* Enteritidis (SE) em granjas e abatedouros no noroeste do Estado de São Paulo. Analisou-se um total de 102 amostras obtidas de granjas de matrizes vacinadas contra SE, frango de corte com histórico de isolamento de *Salmonella spp.*, e também de abatedouros. Detectou-se a ausência de bacteriófagos líticos para SE em 100% das amostras analisadas. Os achados podem estar relacionados a práticas de biossegurança no controle de SE, inclusive o uso de vacinação contra SE em matrizes, reduzindo o agente a níveis não detectáveis por este sistema.

**Palavras-chave:** bacteriófagos, *Salmonella* Enteritidis, avicultura, saúde pública

### ABSENCE OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS LYTIC BACTERIOPHAGES IN SAMPLES FROM POULTRY IN THE NORTHWEST REGION OF SAO PAULO STATE

### ABSTRACT

This study evaluated the presence of lytic bacteriophages of *Salmonella* Enteritidis (SE) in farms and slaughterhouses in São Paulo State northwest region. One hundred two samples from vaccinated breeder hens, salmonella-positive poultry, and slaughterhouses were assessed. No lytic bacteriophages of SE were detected in the samples. We infer that the absence of bacteriophages may be caused by vaccination against SE and good biosecurity practices in field.

**Keywords:** bacteriophage, *Salmonella* Enteritidis, poultry, public health

### AUSENCIA DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS DE ORIGEN AVIAR EN LA REGIÓN NOROESTE DE SÃO PAULO

### RESUMEN

El presente estudio evaluó la presencia de bacteriófagos líticos que infectan *Salmonella* Enteritidis (SE) en granjas y rastros localizados en la región noroeste del Estado de São Paulo. Se analizaron 102 muestras obtenidas en granjas de matrices vacunadas, de pollo de carne con historia de positividad a salmonella y rastros. No fue posible identificar la presencia de bacteriófagos líticos de SE en ninguna de las muestras. Se infiere que la ausencia de

<sup>1</sup> FMVZ/UNESP

<sup>2</sup> Médico Veterinário Autônomo

bacteriófagos sea consecuencia de la vacunación contra SE y las buenas prácticas de bioseguridad en el campo.

**Palavras chave:** bacteriófagos, *Salmonella* Enteritidis, avicultura, salud publica

A *Salmonella* Enteritidis (SE) tem sido o sorovar mais frequente em aves e ambientes avícolas nos últimos anos no Brasil e no mundo, e o agente mais importante causador de infecções alimentares (1-3). Sua presença em aves é, quase sempre, subclínica, podendo ser detectado em todas as etapas da produção avícola ate na carcaça e partes prontas para o comércio (1). A detecção de bacteriófagos líticos ambientais é uma ferramenta que pode ser usada para monitorar e identificar a presença de bactérias-alvo ambientais (4, 5), por sua grande especificidade, ou seja: infectam apenas a bactéria que é seu hospedeiro habitual, e são extremamente abundantes no meio ambiente (6, 7).

A presente comunicação traz dados preliminares de estudo sobre a presença de bacteriófagos líticos em ambiente avícola em granjas e abatedouros do noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. As análises foram realizadas no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ-UNESP/Botucatu-SP).

Foram coletadas um total de 61 amostras de cama (16 de galpões de matrizes e 45 galpões de frango de corte) de três empresas distintas e 41 amostras de água (4 da área de sangria, 3 da área de depenagem, 2 da escaldagem, 25 de tanque de resfriamento, 4 da área da lavagem de caixas e 3 de lavagem de caminhão) em três abatedouros de duas empresas distintas. A presença de bacteriófagos líticos contra SE foi analisada com a técnica de suabe de arrasto em cama de matrizes vacinadas contra SE e em lotes de frangos de corte com histórico de isolamento de *Salmonella* spp. (sorovares não reportados pelas empresas) e em amostras de água de diferentes fases de processamento da linha de abate.

Nas coletas de amostras de cama, após a “varredura” dos galpões com o suabe, estes foram acondicionados em um saco coletor Whirl-Pack® (Sovereign, Taboão da Serra, SP, Brasil) contendo 250 mL de água peptonada, sendo transportados e mantidos em caixa térmica a 8°C até o processamento do material. As amostras de água coletadas diretamente dos tanques com um frasco coletor de água (Sovereign, Taboão da Serra, SP, Brasil) e após serem lacradas, também, foram transportados e mantidos em uma caixa térmica a 8°C até o processamento.

Cada material obtido das amostras de suabe primeiramente foi suspenso com um “massageamento” suave dos sacos e repassado para um becker estéril, seguido de repouso por 1 hora para decantação de material particulado (as amostras de água foram mantidas em repouso para decantação diretamente no frasco coletor). Após a decantação de material particulado as amostras foram pré-filtradas em papel filtro para remoção de material sobrenadante grosseiro. As amostras obtidas por suabe de arrasto foram ainda centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos para peletização de material suspenso fino (que foi desprezado) e recuperação do sobrenadante. Todas as amostras foram então submetidas à filtração dupla (0,4/0,22µm de porosidade) com o sistema Stericup® (Millipore, Billerica, MA, USA) e mantidos sob refrigeração a 5°C.

Para amplificar os possíveis bacteriófagos presentes nas amostras seguiu-se o protocolo conforme Marietto-Gonçalves et al. (8) onde adicionou-se 1 mL dos filtrados, 3 mL de pré-cultivo turvo de SE (amostra pertencente a bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP) em caldo triptona de soja em dupla concentração (TSB2x) a 5 mL de TSB simples. Após 12 horas em cultivo a 40°C filtrou-se o caldo com microfiltro de seringas (porosidade de 0,22 µm de diâmetro) e em seguida realizou-se a contagem de unidades formadoras de placa (UFP) para quantificar e identificar a presença de halos de inibição por ação lítica fágica. Primeiramente realizou-se diluição seriada de 100 µL do

filtrado das culturas em microtubos de polipropileno contendo 900 µL de PBS de 1<sup>-1</sup> a 1<sup>-10</sup> desprezando 100 µL do último microtubo. Paralelamente, em um tubo de ensaio diluiu-se 1 mL de um pré-cultivo de SE em TSB2x em 9 mL de PBS, obtendo-se uma solução de SE 1:9.

Após as diluições adicionou-se o conteúdo de cada microtubo e 100 µL da solução SE 1:9 a tubos de ensaio contendo 3 mL de agar-*Soft* triptona de soja (mantido em banho-maria a 50°C) e, após rápida homogeneização do conteúdo, distribuiu-se em placa de Petri estéril mantido em repouso sob temperatura ambiente para solidificação. As placas de Petri foram incubadas a 40°C por 24 horas para realização da leitura. Para controle positivo da presença de bacteriófagos no estudo amplificou-se, em paralelo ao estudo principal, bacteriófagos de *Escherichia coli* (EC) em cada amostra utilizando-se uma cepa de EC K12 e verificou-se a sensibilidade da amostra de SE usada amplificando-se uma amostra de bacteriófago P22 (ATCC 19585-B1).

Das 102 amostras analisadas, não houve detecção da presença de bacteriófagos líticos para SE, resultando 100% de ausência. A análise de controle detectou a presença de bacteriófagos líticos para EC em 96 amostras, presença em 94,1% das amostras (Tabela 1). Em todas as ampliações, houve a replicação da amostra do bacteriófago P22.

**Tabela 1.** Resultado das análises de detecção da presença de bacteriófagos líticos em diferentes materiais de origem avícola; BF-SE – Bacteriófagos de *Salmonella Enteritidis*, BF-EC – Bacteriófagos de *Escherichia coli*.

Origem	Total de amostras	Total isolado	
		BF-SE	BF-EC
<b>CAMA</b>			
Matrizes	16	0/16	16/16
Frango de corte	45	0/38	38/38
<b>ÁGUA</b>			
Sangria	4	0/4	4/4
Escaldagem	2	0/3	0/3
Depenadeira	3	0/3	3/3
Chiller	25	0/25	22/25
Lavagem de caixas	4	0/4	4/4
Lavagem de caminhão	3	0/3	3/3

A detecção de bacteriófagos líticos de EC na grande maioria das amostras controle assegurou que os métodos empregados estão adequados. A replicação paralela do bacteriófago P22 em todas as ampliações, também, demonstrou que a cepa utilizada no estudo é sensível a atividade fágica, descartando a possibilidade de fago-resistência. Estes dados preliminares mostraram-se negativos em todas as amostras estudadas, ao contrário do que se esperava em função de resultados anteriores onde bacteriófagos líticos de SE foram facilmente isolados de ambiente avícola (9, 10).

Os achados da ausência de detecção de bacteriófagos líticos para SE podem estar relacionados a práticas de biossegurança no controle de SE, inclusive o uso de vacinação contra SE em matrizes (9, 10), reduzindo o agente a níveis não detectáveis por este sistema, nas amostras das varias etapas produtivas de frango de corte.

Assim, conclui-se que a ausência de bacteriófagos sugere, também, aparente ausência de cepas de SE nas amostras ambientais avícolas e de abatedouros analisados.

**REFERÊNCIAS**

1. Andreatti Filho RL. Paratifo aviário. In: Saúde aviária e doenças. São Paulo: Roca; 2007. p.96-111.
2. Berchieri Júnior A, Freitas Neto OC. Salmoneloses. In: Berchieri Júnior A, Silva EP, Di Fábio J, Sesti L, Fagnani Zuanaze MA. Doença das aves. 2a ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas; 2009. p.435-54.
3. Centers of Diseases Control and Prevention (USA). Investigation update: outbreak of Salmonella Typhimurium infections, 2008–2009 [Internet]. Atlanta; 2009 [cited 2012 Apr 09]. Available from: <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium/update.html>
4. Mandilara G, Mavridou A, Lambiri M, Vatapoulos A, Rigas F. The use of bacteriophages for monitoring the microbiological quality of sewage sludge. Environ Technol. 2006;27:367-75.
5. Rees JC, Voorhees KJ. Simultaneous detection of two bacterial pathogens using bacteriophage amplification coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2005;19:2757-61.
6. Mayr A, Guerreiro MG. Virologia veterinária. 2ª ed. Porto Alegre: Sulina; 1981.
7. Rohwer F, Edwards R. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. J Bacteriol. 2002;184:4529-35.
8. Marietto-Gonçalves GA, Lima ET, Donato TC, Rocha TS, Álvarez LEC, Sequeira JL, et al. Eradication of Salmonella Typhimurium in broiler chicks by combined use of P22 bacteriophage and probiotic. Microbiol Res. 2011;3:4-9.
9. Andreatti Filho RL, Higgins JP, Higgins SE, Gaona G, Wolfenden AD, Tellez G, et al. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce Salmonella enterica serovar Enteritidis in vitro and in vivo. Poult Sci. 2007;86:1904-9.
10. Atterbury RJ, Van Bergen MAP, Ortiz F, Lovell MA, Harris JA, De Boer A, et al. Bacteriophage therapy to reduce Salmonella colonization of broiler chickens. Appl Environ Microbiol. 2007;73:4543-9.

**Recebido em: 03/05/12**

**Aceito em: 31/10/12**

## IMPORTÂNCIA DO EXAME COPROLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DA EURITREMATOSE BOVINA

Claudia Mello Ribeiro<sup>1</sup>  
Débora Elenice de Lima<sup>1</sup>  
Satie Katagiri<sup>2</sup>

### RESUMO

O trematódeo *Eurytrema coelomaticum* causa pancreatite e queda na produtividade em bovinos. Com o objetivo de determinar a prevalência da euritrematose em bovinos da Mesorregião do Sudoeste do Paraná, amostras de fezes de 156 bovinos foram processadas utilizando a técnica de sedimentação. Sete dos animais estudados (4,5%) foram positivos para *E. coelomaticum* no exame coprológico supramencionado. Parasitas foram encontrados no pâncreas de dois animais, que por apresentarem agravos concomitantes foram a óbito, indicando que esta parasitose pode levar à debilidade dos mesmos.

**Palavras-chave:** *Eurytrema coelomaticum*, bovino, exame coprológico.

## IMPORTANCE OF COPROLOGY TEST IN THE DIAGNOSIS OF BOVINE EURYTREMATOSIS

### ABSTRACT

The trematodes *Eurytrema coelomaticum* causes pancreatitis and reduces the productivity in cattle. The objective of this study was to determine the prevalence of bovine eurytrematosis in bovines of the southwestern region of Paraná. Fecal samples from 156 cattle were processed by using the sedimentation technique. Seven animals (4.5%) were positive for *E. coelomaticum* in the coprology test aforementioned. Parasites were found in the pancreas of two animals which, for showing concomitant complications, died, indicating that parasitosis causes debility in the animals.

**Keywords:** *Eurytrema coelomaticum*, cattle, test coprology.

## IMPORTANCIA DEL EXAMEN COPROPARASITOSCÓPICO EN EL DIAGNÓSTICO DE EURYTREMATOSIS BOVINA

### RESUMEN

El trematodo *Eurytrema coelomaticum* causa pancreatitis y disminución de la productividad de los bovinos. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de la euritrematosis en bovinos de la región del suroeste del estado de Paraná a través del análisis de muestras fecales de 156 bovinos procesadas por sedimentación. Siete de los animales estudiados (4,5%) fueron positivos para *E. coelomaticum* en el examen coproparasitoscópico. En dos animales que murieron debido a la gravedad de la enfermedad fueron encontrados parásitos en el páncreas. Esto indica que la parasitosis por *E. coelomaticum* puede causar debilidad en los animales.

**Palabras clave:** *Eurytrema coelomaticum*, bovino, examen coproparasitoscópico.

<sup>1</sup> União de Ensino do Sudoeste do Paraná

<sup>2</sup> Universidade Federal do Sergipe

Parasita de ductos pancreáticos, ductos biliares e raramente intestino delgado de bovinos, *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae) apresenta ciclo evolutivo heteroxeno, sendo o primeiro hospedeiro intermediário representado pelo molusco *Bradybaena similis* e, o segundo, por artrópodes do gênero *Conocephalus*. Os ruminantes, hospedeiros definitivos, adquirem a infecção por ingestão acidental dos insetos ou de metacercárias eliminadas pelos insetos sobre as pastagens. Esta particularidade da biologia deste trematoda dificulta seu controle, uma vez que, atualmente não é permitida a aplicação de moluscidas ou inseticidas para controle dos hospedeiros intermediários, pois essas drogas têm efeito residual que pode causar significativo impacto ambiental (1).

Nos bovinos, as infecções por *E. coelomaticum* causam pancreatite caracterizada por fibrose intersticial e periductal, comprometendo o fluxo de secreção exócrina e o processo de digestão dos alimentos. Os sinais clínicos da euritrematose bovina incluem queda da produtividade, emaciação e morte. Entretanto, na maioria das vezes, a enfermidade é subclínica e o diagnóstico ocorre somente durante a inspeção *post-mortem*. Perdas econômicas devidas à euritrematose são decorrentes da condenação do pâncreas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) e da perda de peso observada nos animais parasitados (2).

No Brasil, a euritrematose bovina já foi reportada nos Estados do Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio Grande do Sul (3), São Paulo, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (4). Porém, nos últimos anos a incidência da euritrematose tem aumentado drasticamente, principalmente no Estado do Paraná (2).

O diagnóstico da infecção por *E. coelomaticum* é realizado por exame coprológico, entretanto esse método tem sido pouco utilizado na prática clínica, sendo que a enfermidade é geralmente detectada durante a necropsia ou inspeção *pos-mortem* (5). Portanto, este estudo teve como objetivo determinar a prevalência da euritrematose em bovinos utilizando uma técnica de sedimentação.

Durante os meses de setembro de 2010 a maio de 2011, foram coletadas amostras de fezes de 156 bovinos das raças holandesa, girolanda ou jersey, pertencentes a oito propriedades com sistema extensivo de produção e localizadas no Município de Dois Vizinhos, Mesorregião do Sudoeste do Paraná. As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal com luvas de palpação, sendo acondicionadas na própria luva e mantidas sob refrigeração até o processamento. As fezes foram processadas segundo a técnica de sedimentação descrita por Foreyt (6).

Os animais que foram a óbito durante o experimento, foram necropsiados e o pâncreas e a vesícula biliar, inspecionados. Os trematódeos coletados durante o procedimento foram identificados como *E. coelomaticum*, segundo Travassos, Freitas e Kohn (7). Os resultados obtidos neste estudo foram submetidos à análise estatística pelo teste do Qui-Quadrado.

Escassas são as referências bibliográficas relativas ao diagnóstico de euritrematose por técnicas coprológicas. Entretanto, dentre os métodos de sedimentação, a técnica de Dennis-Stone & Swanson têm sido referência para o diagnóstico da infecção por *E. coelomaticum* em bovinos (8).

Neste estudo foi utilizada a técnica de sedimentação descrita por Foreyt e observados ovos de *E. coelomaticum* em 4,5% (7/156) das amostras de fezes analisadas. Esta técnica de sedimentação tem sido usada com sucesso na detecção de ovos de *Fasciola hepatica*, trematoda frequentemente encontrado parasitando o fígado de bovinos, e que leva a grandes perdas econômicas pela diminuição da produtividade e pela elevada condenação de fígados nos matadouros (9).

Em uma das propriedades estudadas, um bovino positivo para *E. coelomaticum* no exame coprológico, sofreu intervenção cirúrgica para instalação de uma fístula ruminal. Apesar da instituição de tratamento com antibioticoterapia no pós-operatório, o animal não se recuperou e foi a óbito, cinco dias após a cirurgia. Na necropsia, o pâncreas apresentava-se de

tamanho e coloração normais, sem apresentar alterações macroscópicas nos ductos ou no parênquima, mas foi detectado parasitismo por trematódeos, posteriormente identificados como *E. coelomaticum*. Um segundo animal, da mesma propriedade e positivo para *E. coelomaticum* no exame coprológico, apresentou apatia, anemia, anorexia e decúbito esternal. O diagnóstico dado ao animal foi de anaplasmose. Apesar do tratamento instituído para anaplasmose, o animal foi a óbito após oito dias. Na necropsia, *E. coelomaticum* adultos foram encontrados no interior dos ductos pancreáticos, que se apresentavam dilatados.

Escassos são os estudos epidemiológicos da euritrematose bovina. Em um desses estudos, Azevedo et al. (10) analisaram dados do SIF referentes a bovinos oriundos de duzentas cidades do norte do Estado do Paraná e abatidos durante o ano de 2000. Os autores verificaram uma prevalência média de 12,1% de animais parasitados por *E. coelomaticum*. Yamamura, Honer e Lopes (11) também analisaram dados de registros do SIF de um matadouro-frigorífico da Mesorregião do Noroeste do Paraná que abateu bovinos de 48 cidades da região; eles constataram que 37,24% dos bovinos abatidos estavam infectados por *E. coelomaticum*.

A prevalência (4,5%) de infecção por *E. coelomaticum* em bovinos detectada neste estudo difere dos relatos anteriores. Deve-se considerar que neste estudo, um pequeno número de bovinos foi investigado e utilizou-se uma técnica coprológica baseada na sedimentação (6) para o diagnóstico da euritrematose bovina e não a inspeção visual do pâncreas, considerada padrão-ouro. No caso da euritrematose bovina, o uso de uma técnica coprológica para o diagnóstico é de suma importância, pois é o único instrumento disponível na prática clínica, além de fornecer informações importantes sobre a epidemiologia da enfermidade. De acordo estão Belém et al. (5) que afirmaram ser o exame parasitológico de fezes uma importante ferramenta no diagnóstico da euritrematose bovina e que, pela determinação do número de ovos por grama de fezes (OPG) é possível caracterizar satisfatoriamente o grau de lesão pancreática apresentado pelos bovinos, sem se recorrer a exames histológicos de pâncreas.

Como relatado anteriormente, dois animais parasitados por *E. coelomaticum* foram a óbito: um deles após uma cirurgia e, o outro, devido a uma enfermidade concomitante, a anaplasmose. Isso demonstra que a parasitose por *E. coelomaticum*, apesar de muitas vezes ser subclínica, pode levar à debilidade física do animal e quando este sofre algum tipo de infecção concomitante, a recuperação é dificultada, muitas vezes levando o animal a óbito.

Conclui-se que o exame coprológico é uma ferramenta importante no diagnóstico da euritrematose bovina; porém é necessário mais estudos em relação à epidemiologia da enfermidade para que se estabeleçam medidas de controle eficazes dos hospedeiros intermediários, pois essa enfermidade causa importantes perdas econômicas para a bovinocultura.

## REFERÊNCIAS

1. Bassani CA, Sangioni LA, Saut JPE, Headley SA, Yamamura MH. Euritrematose bovina. *Semina Cienc Agrar*. 2007;28:299-316.
2. Bassani CA, Sangioni LA, Saut JPE, Yamamura MH, Headley SA. Epidemiology of eurytrematosis (*Eurytrema* spp. Trematoda: Dicrocoeliidae) in slaughtered beef cattle from the central-west region of the State of Paraná, Brazil. *Vet Parasitol*. 2006;141:356-61.
3. Brito DB, Francis M, Carvalho ECR. Patogenicidade do *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892, LOOSS, 1907). *Rev Bras Med Vet*. 1981;4:17-21.
4. Costa HMA, Leite ACR, Guimarães MP, Lima WS. Distribuição de helmintos parasitas de animais domésticos no Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 1986;4:465-79.

5. Belém PAD, Oliveira MR, Padovani CR, Luvizotto MC. Alterações pancreáticas em bovinos naturalmente infectados por *Eurytrema* sp. e sua associação com a carga parasitária e o número de ovos por grama de fezes (OPG). *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1994;31:273-81.
6. Foreyt WJ. *Parasitologia veterinária*. São Paulo: Roca; 2005.
7. Travassos LP, Freitas JFT, Kohn A. Trematódeos do Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1969;67:1-886.
8. Belém PAD, Oliveira MR, Padovani CR. Estimativa da carga parasitária (*Eurytrema* sp.) de bovinos em função do número de ovos por grama de fezes (OPG). *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1992;29:363-5.
9. Martins IVF, Bernardo CC, Avelar BR, De Araújo IBBA, Donatele DM, Nunes LC. Sensibilidade e reprodutibilidade da técnica de sedimentação (Foreyt, 2005) para o diagnóstico de *Fasciola hepatica*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2008;17:110-2.
10. Azevedo JR, Mannigel RC, Agulhon AZ, Borba TR, Barbiéri AW, Oliveira DCL, et al. Prevalence and geographical distribution of bovine eurytrematosis in cattle slaughtered in northern Paraná, Brazil. *Pesqui Vet Bras.* 2004;24:23-6.
11. Yamamura MH, Honer MR, Lopes CWG. Avaliação patológica da euritrematose em bovinos naturalmente infectados na região de Londrina, Paraná. *Semina Cienc Agrar.* 1995;16:89-99.

**Recebido em: 16/05/12**

**Aceito em: 30/01/13**

## ASPECTOS RELACIONADOS COM A RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS DA RAÇA BRASILEIRO DE HIPISMO, UTILIZADAS EM PROGRAMA COMERCIAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO

Carlos Eduardo Camargo<sup>1</sup>  
Romildo Romualdo Weiss<sup>2</sup>  
Luiz Ernandes Kozicki<sup>1\*</sup>  
Marília Pastorello Duarte<sup>3</sup>  
Mario Cesar Garcia Duarte<sup>3</sup>  
Melina Andrea Formighieri Bertol<sup>4</sup>  
Francisco Romano Gaievski<sup>5</sup>  
Guilherme de Medeiros Bastos<sup>6</sup>

### RESUMO

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar alguns aspectos relevantes, com potencial de interferência nos índices de fertilidade, de um Centro Comercial de Transferência de Embriões em éguas da raça Brasileiro de Hipismo. A análise dos dados correspondeu às temporadas reprodutivas de 2003/2004, 2004/2005, 2005/2006 e 2006/2007, perfazendo 699 dados de colheitas de embrião de 120 animais doadores. Dentre as 120 éguas doadoras de embrião, havia animais saudáveis sob o aspecto reprodutivo assim como animais com certas dificuldades na manutenção da gestação. Avaliou-se a conservação do sêmen gerador dos embriões, meses do ano de execução das colheitas, idade embrionária e ovulação (simples ou múltipla). Foram observadas diferenças ( $p < 0,05$ ) relativas ao tipo de sêmen empregado nas inseminações artificiais (IAS), somando-se ao expressivo uso de sêmen congelado nas transferências de embrião (TEs); não houve diferença entre o percentual de embriões colhidos dentro ou fora da estação reprodutiva; observou-se diferença ( $p < 0,01$ ), nas colheitas feitas no dia 7, 8 e 9 pós ovulação ao se comparar com as taxas de recuperação dos dias 6 e 10; relativamente ao tipo de ovulação das éguas (ovulação simples ou múltipla), verificou-se que nas ovulações múltiplas colheu-se maior número de embriões ( $p < 0,01$ ) do que nas simples.

**Palavras-chave:** égua doadora; raça Brasileiro de Hipismo; transferência de embriões; recuperação embrionária; idade embrionária

### SOME RELEVANT FACTORS REGARDING EMBRYONIC RECOVERY RATES IN A PROGRAM OF EMBRYO TRANSFER IN BRAZILIAN JUMPING HORSE MARES

### ABSTRACT

The aim of the present research was to evaluate some relevant aspects, potentially able to interfere in the fertility rates of Brazilian horse jumping mares from a Trade Center of Embryo Transfer. Results from a total of 699 embryos samples from 120 donors animals were

<sup>1</sup> Docente - Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Curitiba

<sup>2</sup> Docente - Universidade Federal do Paraná

<sup>3</sup> Médicos Veterinários Autônomos

<sup>4</sup> Mestrado em Processos Biotecnológicos - UFPR

<sup>5</sup> Mestrado em Ciência Animal - Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

<sup>6</sup> Docente - Universidade Estadual do Centro-Oeste

\* Autor para correspondência: e mail: [Kozicki.l@pucpr.br](mailto:Kozicki.l@pucpr.br) – Rua Duque de Caxias, 807, ap.31, CEP 80530-040 - Curitiba - Paraná

considered and analysed, covering the reproductive seasons of the years 2003/2004, 2004/2005; 2005/2006 and 2006/2007. Among the 120 embryo donors, there were both healthy and problem mares, in regard to their reproducing ability. It has been observed significative differences in the artificial inseminations (IAS) in regard to the used method for semen preservation, having an expressive use of frozen semen in the equine embryo transfers (TES). On the other hand, no differences were found in the percentage collected embryo of within or out of the reproductive station, in regard to the collect carried out in different months of the respective year. Concerning to the rates of embryonary recovery and age a difference ( $p < 0.01$ ) has been observed in the collects carried out at the days 7, 8 and 9 after the ovulation, when compared with the recovery rates from the days 6 and 10. Data relative to the embryonary recovery in relation to the mares type of ovulation (single or multiple) it has been found that a larger number of embryos ( $p < 0,01$ ) was observed in mares with multiple ovulation in comparison to those with single ovulation.

**Keywords:** donor mare, jumping mare, embryo transfer, embryo recovery, embryo age,

## FACTORES RELACIONADOS CON LA RECUPERACIÓN EMBRIONARIA EN YEGUAS DE LA RAZA BRASILEÑO DE HIPISMO UTILIZADAS EN PROGRAMAS COMERCIALES DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

### RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar algunos factores relevantes que pueden interferir potencialmente en los índices de fertilidad de un Centro Comercial de Transferencia de Embriones en yeguas de la raza Brasileño de Hipismo. El análisis correspondió a las temporadas reproductivas de 2003/2004, 2004/2005, 2005/2006 y 2006/2007, y se realizó a través de la extracción de 699 datos de colección embrionaria de 120 animales donadores. Entre las 120 yeguas donadoras de embriones, había animales saludables reproductivamente hablando, así como animales con algunas dificultades para la mantener la gestación. Fueron evaluadas las siguientes variables: tipo de conservación de semen generador de los embriones, meses del año en que las colectas eran ejecutadas, días de ovulación de la donadora (edad embrionaria) y tipo de ovulación (única o múltiple). Fueron observadas diferencias ( $p < 0,05$ ) relativas al tipo de semen empleado en las inseminaciones artificiales (IAS), sumándose al uso significativo de semen congelado en las transferencias de embriones (TEs) equinas; en relación a las colectas realizadas en diferentes meses del año, no hubo diferencia entre el porcentaje de embriones colectados dentro o fuera de la estación reproductiva; hablando de las tasas de recuperación y la edad embrionaria, se observó diferencia ( $p < 0,01$ ), en las colectas hechas los días 7, 8 y 9 después de la ovulación al compararse con las tasas de recuperación de los días 6 y 10; los datos referentes a la recuperación embrionaria tomando en consideración el tipo de ovulación (única o múltiple), arrojaron como resultado que en las ovulaciones múltiples se colectó un mayor número de embriones ( $p < 0,01$ ) que durante la ovulación única.

**Palabras claves:** yegua donadora; raza Brasileño de Hipismo; transferencia de embriones; recuperación embrionaria; edad embrionaria.

### INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os profissionais da área de transferência de embrião (TE) têm demonstrado expressivo avanço na aplicabilidade da técnica na espécie equina, executando

em torno de 3.500 transferências, por ano, de acordo com levantamento da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS (1). Nesse contexto, inserem-se animais jovens, adultos, bem como os idosos, com histórico reprodutivo insatisfatório, em função de insucessos na produção de um potro, seja pela de cobertura natural ou inseminação artificial (IA). As taxas de mortalidade embrionária nas éguas idosas são mais elevadas e a fertilidade decresce com a idade segundo Merkt, Klug e Jochle (2), Lopes (3) e Squires, Carnevale e Mccue (4).

De acordo com Squires, Carnevale e Mccue (4), éguas que estão em competição, são também fortes candidatas a serem submetidas a esta biotecnologia. A qualidade do sêmen a ser utilizado em um programa de TE é um fator de extrema importância, uma vez que a seleção dos garanhões é baseada em suas características morfológicas e desempenho atlético, raramente considerando-se a questão da fertilidade; não é incomum ocorrer a redução da recuperação embrionária devido à utilização de sêmen de má qualidade. A fertilidade do sêmen é extremamente variável entre os garanhões. Segundo Squires, Mccue e Vanderwall (5) e Cuervo-Arango (6) o sêmen fresco geralmente gera melhores resultados de recuperação embrionária do que o sêmen refrigerado ou o congelado. Por sua vez, Backman et al. (7) relatam que a criopreservação do sêmen é dificultada por questões técnicas a serem solucionadas como, por exemplo, a variação individual durante a criopreservação, o baixo rendimento de doses por ejaculado, o intenso manejo das éguas durante as IAs, o maior custo por prenhez, além das significativas variações das taxas de prenhez, em relação às obtidas com a monta natural ou com a IA, ao utilizar-se sêmen fresco ou refrigerado.

Squires et al. (8) estudaram as características reprodutivas de éguas que apresentaram ovulações espontâneas simples ou múltiplas e de éguas superovuladas com extrato de pituitária equina. A recuperação embrionária no sétimo dia pós-ovulação foi de 58,2% para éguas com ovulação simples e de 106% para éguas com ovulação dupla espontânea. Carmo et al. (9), pesquisaram a incidência de ovulações duplas em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. De um total de 829 ciclos estrais analisados, 47,0% apresentaram ovulações simples e 53,0% ovulações duplas ou triplas. A taxa de recuperação embrionária foi de 59,0% para os ciclos reprodutivos com ovulações simples e de 88,0% para os ciclos com mais de uma ovulação. Contudo, Losinno, Aguillar e Lisa (10), descreveram algumas particularidades em algumas raças equinas, ao relatarem a incidência de múltipla ovulação em éguas Puro Sangue Inglêss, Pólo Argentino, Quarto de Milha e Apaloosa. Recentemente, Raz et al. (11), obtiveram taxas de recuperação embrionária de 73%, ao trabalharem com éguas de um programa comercial de TE durante a estação reprodutiva. Goretti et al. (12), recuperaram 70 e 80 % de embriões, obtidos de éguas tratadas e controles com prostaglandina F2 alfa, dois dias antes da colheita e no dia da colheita embrionária respectivamente.

Fleury e Alvarenga (13), trabalhando em um programa comercial de TE em equinos no Brasil, executaram 917 colheitas de embriões, não verificando diferenças significativas na recuperação embrionária executada nos dias sete, oito e nove pós-ovulação, perfazendo percentuais de 49,3, 58,0 e 54,5% respectivamente. Pesquisadores têm se preocupado com o dia da colheita embrionária. Squires et al. (8) e Daels (14), preconizaram os dias 8 e 9 após a ovulação em éguas mais idosas. Sirois, Ball e Fortune (15), relataram que 50% de embriões colhidos entre 10,5 e 13,5 dias pós-ovulação não se desenvolveram em função do colapso nas mangueiras do lavado sifonado, sendo por isso, descartados. Da mesma forma Squires (16), já ressaltava que os melhores índices de gestação, haviam sido obtidos com embriões de oito dias de idade, ao invés de estruturas embrionárias com nove dias de vida.

Segundo Ginther et al. (17), nas éguas ocorre um padrão de reprodução, tipicamente sazonal, no qual a incidência de ovulação é mínima durante o inverno, aumentando gradativamente durante a primavera, até a máxima ocorrência durante o verão, seguida de redução novamente no outono. Saltiel et al. (18), pesquisando éguas de abatedouro, no sul do

México, verificaram que 10,0% demonstraram ovulações em janeiro e fevereiro, portanto, fora da estação de monta (inverno no Hemisfério Norte).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os tipos de conservação do sêmen equino (fresco, refrigerado, ou congelado), os meses do ano em que as colheitas foram executadas (dentro e fora da estação reprodutiva), o dia da colheita embrionária após a ovulação da doadora e tipo de ovulação (simples ou múltiplas) em relação à taxa de recuperação embrionária em um programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados, dados de 699 colheitas de embrião equino, procedentes de um Centro Comercial de Transferência de Embriões, correspondendo às temporadas reprodutivas de 2003/2004, 2004/2005, 2005/2006 e 2006/2007. As doadoras de embriões eram da raça Brasileiro de Hipismo, com idade entre 5 e 23 anos, num total de 120 éguas reprodutivamente saudáveis ou com dificuldades de conduzir a gestação (dificuldades emanadas de: cistos ou fibrose endometrial em variados graus, má conformação de períneo ou de vulva, endometrite pós IA, insuficiência de progesterona pelo corpo lúteo, senilidade, etc...), mas com bom potencial genético para a utilização em programas comerciais de TE. Os animais foram mantidos em piquetes ou em cocheiras, com acesso à água e ao sal mineralizado *ad libitum*, bem como a uma fonte de volumoso e de concentrado. Foram estudadas as variáveis relacionadas com a recuperação embrionária, tipo de conservação do sêmen (a fresco, refrigerado ou congelado) utilizado nas IAs, os meses do ano em que foram efetuadas as colheitas, o dia da colheita após a ovulação (idade do embrião) e o tipo de ovulação (simples ou múltipla). O sêmen a fresco (colhido por vagina artificial) foi composto pelo ejaculado (obtenção "in loco" na Central de Reprodução Equina), mais uma solução diluente a base de leite em pó desnatado, antibiótico e glicose na diluição de 1:1, gerando uma concentração de 500 milhões de espermatozoides viáveis por dose inseminante, com a média de 80 % de motilidade progressiva; o refrigerado (procedência brasileira de diversos locais), originou-se do ejaculado mais a mesma solução diluidora mencionada, à base de diluição de 3:1, proporcionando um bilhão de espermatozoides por dose inseminante e com 70% de motilidade, transportado no máximo por 24 horas; e o sêmen congelado tinha procedência de Centrais Europeias de Inseminação Artificial com 100 milhões de espermatozoides por palheta, empregando-se de uma a três (dependendo da recomendação da Central de Congelamento), com a motilidade média progressiva de 40 %.

### Análise estatística

Os resultados foram analisados empregando-se o teste do Qui-Quadrado e análise de variância – ANOVA, ao nível de  $\alpha=0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as quatro estações reprodutivas pesquisadas nesse trabalho, foi empregado o sêmen de vários ganhões de fertilidade comprovada. Verificou-se que das 662 colheitas de embrião empreendidas, em 164 havia sido utilizado o sêmen a fresco, em 167 o sêmen refrigerado e em 331 colheitas o sêmen congelado (Tabela 1). Denota-se, portanto, substancial empregabilidade de sêmen congelado nas IAs, contrariamente às afirmações de Squires, Mccue e Vanderwall (5) ao relatarem a restrita utilização do sêmen congelado empregado nesta biotecnologia. Ocorreu que, nestes últimos dez anos, houve pujante aplicabilidade prática do sêmen congelado, em função não só da melhoria das técnicas de congelamento de sêmen equino, bem como da praticidade de seu uso, ao se poder dispor de sêmen de

garanhões de elevada performance, que porventura encontrem-se distantes, ou que tenham vindo a óbito. Esses fatos colaboraram para uma sensível maior demanda por parte dos criadores de cavalos de hipismo, além da preocupação de melhoria da qualidade genética dos animais. Muito embora a performance de congelamento de sêmen equino, tenha sofrido significativos avanços nos últimos anos, ainda verificou-se nessa pesquisa, que as IAs processadas com sêmen congelado, geraram menor número de embriões ( $p<0,05$ ) do que com o sêmen a fresco e com o refrigerado, sinalizando ainda a necessidade de busca de conhecimentos mais aprofundados, para congelar a célula espermática, de modo a aproximar-se dos índices de prenhez ao se empregar o sêmen a fresco e o refrigerado, corroborando relatos de Brinsko e Varner (19) e Backman et al. (7) ao citarem que a percentagem de prenhez empregando-se o sêmen congelado, é reduzida e bastante variável, em função da variação dos protocolos de congelamento, ao efeito do garanhão, à diferença da fertilidade das éguas e aos diferentes protocolos de inseminação adotados.

Tabela 1. Taxas de recuperação embrionária de éguas doadoras da Raça Brasileiro de Hipismo, empregando-se a inseminação artificial com sêmen fresco, refrigerado ou congelado, bem como as de embrião, realizadas de 2003 a 2007, em diferentes meses do ano ( $n=662$ ).

Colheitas	Tipo de sêmen empregado nas Inseminações artificiais			Períodos do ano	
	Fresco	Refrigerado	Congelado	Set-Fev	Mar-Ago
com embrião (n, %)	102(62,1) <sup>a</sup>	104(62,2) <sup>a</sup>	171(51,6) <sup>b</sup>	306(58,5)	88(51,1)
sem embrião (n, %)	62(37,8)	63 (37,7)	160 (48,3)	217(41,4)	84(48,8)
Total	164	167	331	523	172

Letras diferentes na mesma linha é significante ( $p<0,05$ ).

Em função da disponibilidade de um numero significativo de dados sobre colheitas de embrião, dentro e fora da estação reprodutiva, isto é, colheitas levadas a efeito em meses não comuns a essa atividade, resolveu-se discutir esta variável. Foi estabelecida uma comparação de dados obtidos na temporada de monta equina (setembro, outubro, novembro, dezembro, janeiro e fevereiro), com os meses fora da estação reprodutiva que no Hemisfério Sul, engloba os meses de março, abril, maio, junho, julho e agosto. Foram utilizadas 695 colheitas de embrião para esta análise. Segundo a tabela 1, observa-se nitidamente, maior número de colheitas realizadas entre os meses de setembro e fevereiro dos quatro períodos analisados, em função do esperado maior numero de TEs dentro da estação de monta, confirmando dados de Arruda (20), de Ginther et al. (17) e de Daels (14) de que as éguas são classificadas como poliétricas estacionais, por ciclarem dentro da estação reprodutiva (primavera e verão). Porém, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os índices de recuperação embrionária, ou seja na taxa de prenhez entre os dois períodos. Éguas que ciclaram fora da temporada de monta proporcionaram índice de recuperação embrionária, muito próximo ao das colheitas executadas dentro da estação reprodutiva. Saliente-se que esses dados são muito importantes, pois não é usual executar-se a TE fora da estação de monta no Brasil, dados esses sugestivos de que é possível trabalhar com a TE, nos meses de outono e inverno, gerando substanciais lucros aos criadores de equinos de elevada performance. Isso vem corroborar relatos de profissionais que trabalham comercialmente em Central de Reprodução Equina, de que é possível, produzir embriões, mesmo fora da estação reprodutiva. Ao se tratar de reprodução, sabe-se que o hipotálamo equino é sensível à luz. No caso da presente pesquisa, os animais estavam em criações correspondentes à altura do paralelo 24, onde a quantidade de horas de luz natural/dia é maior, sinalizando que a latitude poderia exercer função importante sobre esse fato, uma vez que a medida em que a latitude é menor, haverá mais horas de luz por dia,

favorecendo à ciclicidade sexual dos animais, principalmente ao se associar adequada nutrição a eles. Segundo Duarte (2009)<sup>7</sup>, além desses fatos, é possível que, com luz artificial, algumas éguas venham a ciclar, podendo ser aproveitadas num programa de TE, mesmo fora da estação reprodutiva.

Dados relativos à idade embrionária em que as colheitas eram executadas, indicaram o período de 6 a 10 dias após a ovulação das doadoras, com predominância das colheitas efetuadas no 7º, 8º e 9º dias (Tabela 2). Em torno de 92,0 % dos embriões recuperados nas quatro temporadas de monta, encontravam-se com 8 ou 9 dias de idade.

Tabela 2. Taxa de recuperação de embriões eqüinos em doadoras da raça Brasileiro de Hipismo, comparando-se os dias de ovulação (idade embrionária), bem como a incidência de ovulação simples ou múltipla. (2008)

	Dias da ovulação da doadora					Tipo de ovulação	
	D6	D7	D8	D9	D10	Simples (n) (%)	Múltipla (n) (%)
colheita+(n)	2 <sup>a</sup>	14 <sup>b</sup>	189 <sup>b</sup>	181 <sup>b</sup>	6 <sup>a</sup>	193(47,7) <sup>a</sup>	142(67,9) <sup>b</sup>
(%)	(18,1)	(56,0)	(64,5)	(52,6)	(35,3)		
Colheita-(n)	9	11	104	163	11	211 (52,2)	67 (32,0)
(%)	(81,9)	44,0	35,5	47,4	64,7		
Total	11	25	293	344	17	404	209

Letras diferentes na mesma linha e variável é significativa ( $p < 0,01$ )

Pesquisas de Mortensen et al. (21) e Kumar et al. (22), reportaram avanços no percentual da recuperação embrionária, com taxas de 63,0% e de 81,1% respectivamente, porém isto ainda não se observa para éguas superovuladas. Raz, Carley e Card (23) obtiveram apenas 36,0% de embriões recuperados por ovulação em éguas tratadas com FSH-e. Mais recentemente Raz et al. (11), tiveram sucesso em 73 % de taxa de recuperação embrionária em estudo sobre TE. Por sua vez Goretti et al. (12), em estudo executado em Minas Gerais com éguas da raça Manglarga e Campolina, obtiveram taxa de recuperação de até 80%. Araújo et al. (24) realizando um ajuste na dose e na frequência de administração do FSH-e, juntamente com a seleção de animais e baseando-se na população folicular, relataram ser possível induzir e recuperar ovulações duplas e triplas, a um custo inferior aos protocolos superovulatórios convencionais. Essa sistemática de distribuição adotada pelos profissionais da Central de Reprodução de onde foram colhidos os dados, justifica-se pelo fato de que nessa idade o embrião é facilmente visualizado a olho nú, no fundo do filtro coletor embrionário imerso no líquido de lavagem, agilizando o procedimento da colheitas, identificação e transferência, de acordo com Fleury e Alvarenga (13), Silva (25) e Cuervo-Arango (6).

Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre as colheitas feitas no 7º, 8º e 9º dia pós-ovulação. Porém, entre as coletas feitas no 6º e no 10º dia pós ovulação, houve diferença significativa em relação aos outros dias mencionados (Tabela 2), resultando em menores índices de recuperação embrionária, dados esses bastante similares aos relatados por Iuliano (26), Iuliano et al. (27), Mckinnon, Squires e Voss (28) e por Silva (25). Squires, Mccue e Vanderwall (5) e Daels (14) relataram que colheitas realizadas seis dias após a ovulação, geralmente proporcionam resultados ligeiramente inferiores aos embriões de sete ou mais dias, mas tornam-se necessárias, quando se deseja congelar os embriões, em função da sua maior viabilidade após a congelação e descongelação. Iuliano (26) e Iuliano et al. (27) igualmente obtiveram taxa de recuperação embrionária em equinos menor no 6º dia pós-ovulação (66,0%) do que no dia oito (82,0%). Fleury e Alvarenga (13) e Fleury et al. (29) trabalhando em um programa comercial de TE em eqüinos no Brasil, com grande número de colheitas,

<sup>7</sup>Duarte MP. 2009. Centro Comercial de Reprodução Equina, Itapetininga (SP) - Comunicação oral.

Camargo CE. et al. Aspectos relacionados com a recuperação embrionária em éguas da raça Brasileiro de Hipismo, utilizadas em programa comercial de transferência de embrião. Vet. e Zootec. 2013 mar.; 20(4): 74-83.

reforçam os dados do presente trabalho, ao não verificarem diferenças significativas na recuperação embrionária nos dias sete, oito e nove pós-ovulação (49,3 58,0 e 54,5%), respectivamente.

Dos dados ainda disponíveis verificou-se o tipo de ovulação das doadoras, isto é, se a ovulação era simples ou múltipla. A figura 1 revela o número de ciclos reprodutivos que apresentaram ovulações simples ou múltiplas. De um total de 613 ciclos reprodutivos com ovulação, em 209 (34,0%) houve dupla ou mais ovulações. Esse valor é muito próximo ao encontrado por Davies Morel, Newcombe e Swindlehurst (30), que avaliando 3075 ovulações de 2112 ciclos reprodutivos, encontraram 70,7% de ovulações simples e 29,3% de ovulações múltiplas, diferindo dos relatos de Sertich (31) e dos de Carmo et al. (9), os quais descreveram a incidência de múltiplas ovulações em éguas de raças européias de 55,9%, e 53,0 % respectivamente, percentuais esses bastante superiores aos da presente pesquisa, ainda mais ao se levar em consideração de que a raça Brasileiro de Hipismo carrega em sua genética significativo percentual de genética européia. Tal diferença poderia ser sustentada em função de que os dados do presente trabalho foram colhidos de um Centro Comercial de Reprodução Equina, receptor de animais reprodutivamente sadios e problemáticos e não simplesmente de um criatório de eqüinos onde sabidamente as éguas são geralmente férteis.

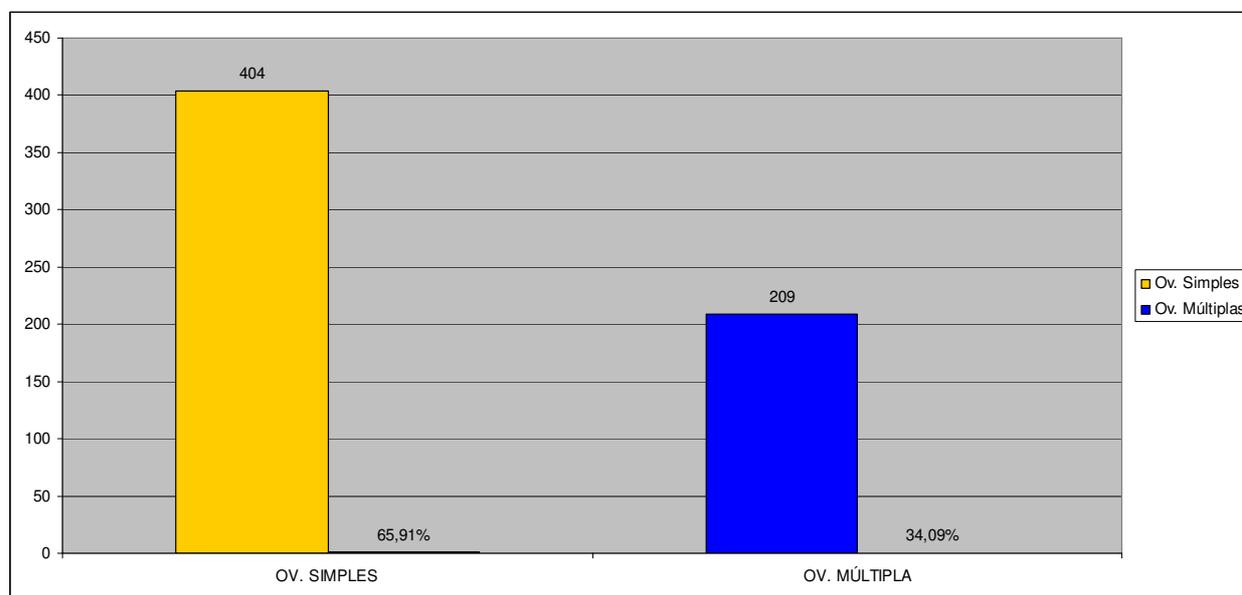


Figura 1. Incidência (%) de ciclos reprodutivos em éguas da raça Brasileiro de Hipismo, detentoras de ovulação simples ou múltipla. (n= 613).

A tabela 2 e a figura 1, mostra a existência de diferença ( $p < 0,05$ ) entre animais que tiveram ovulação simples ou múltipla, revelando que éguas com múltipla ovulação detém taxa de recuperação embrionária superior às de ovulação simples. Alvarenga, Maccue e Bruemmer (32) e Carmo et al. (9) afirmam que o aumento do número de ovulações é altamente desejável e elevam o percentual de embriões recuperados por éguas doadoras de embriões na TE. Contudo, é muito pertinente a preocupação alusiva ao manejo reprodutivo, pois, gestações gemelares são absolutamente indesejáveis na espécie eqüina. Esses mesmos autores avaliaram 829 ciclos reprodutivos de éguas da raça Brasileiro de Hipismo, detectando 390, 360 e 79 ciclos com ovulação simples, dupla e tripla, respectivamente, totalizando 617 embriões recuperados, sendo 230, 306 e 81 embriões provenientes de ovulações simples, duplas e triplas respectivamente, perfazendo, portanto 53,0 % de ovulações múltiplas.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que: o emprego de sêmen congelado, visando a TE em equinos de hipismo, cresceu nos anos analisados; as taxas de recuperação embrionária com sêmen congelado, ainda são menores que as com sêmen a fresco ou refrigerado; é possível produzir embriões fora da estação reprodutiva em éguas, desde que haja ciclos ativos nos meses críticos do ano; não houve diferença nas taxas de recuperação embrionária entre os dias 7, 8 e 9 pós ovulação da doadora, mas ocorreu diferença entre os dias 7, 8 e 9 ( $p < 0,01$ ) ao se comparar com o 6° e o 10° dia, assim como entre a ovulação simples e múltipla em prol da última ( $p < 0,01$ ).

## REFERÊNCIAS

1. Carneiro GF. Transferência de embriões em equinos. In: Anais do 16° Congresso Brasileiro de Reprodução Animal; 2005, Goiânia. Goiânia: CBRA; 2005.
2. Merkt H, Klug E, Jochle W. Reproduction management in the german thoroughbred breeding industry. *J Equine Vet Sci.* 2000;20:231-9.
3. Lopes EP. Desmistificando a transferência de embriões. *Top 2000 Mangalarga Marchador.* 2002;1:6.
4. Squires EL, Carnevale EM, Mccue PM. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology.* 2003;59:151-70.
5. Squires EL, Mccue PM, Vanderwall D. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology.* 1999;51:91-104.
6. Cuervo-Arango J. Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound. *Theriogenology.* 2009;71:1267-75.
7. Backman T, Bruemmer JE, Grahan JK, Squires EL. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *J Anim Sci.* 2004;82:690-4.
8. Squires EL, McClain MG, Ginther OJ, Mckinnon AO. Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. *Theriogenology.* 1987;28:609-13.
9. Carmo MT, Trinke CLN, Lima MM, Medeiros ASL, Alvarenga MA. Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. *Rev Bras Reprod Anim.* 2002;26:252-4.
10. Losinno L, Aguilar JJ, Lisa H. Impact of multiple ovulation in a commercial equine embryo transfer program. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer; 2000, Saari. Saari, Finland: Havemeyer Foundation Monograph Series; 2000. n.3, p.81-3.*
11. Raz T, Carley SD, Green JM, Card CE. Evaluation of two oestrus synchronization regimens in eFSH-treated donor mares. *Vet J.* 2011;188:105-9.

12. Goretti RG, Araújo RR, Rocha Filho AN, Araújo GHM, Lopes EP. Effects of timing of induced luteolysis in embryo donor mares on reproductive performance and pregnancy rate in recipient mares. *Theriogenology*. 2011;75:1170-4.
13. Fleury JJ, Alvarenga MA. Effects of collection day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. *Theriogenology*. 1999;51:261-2.
14. Daels P. Embryo transfer tips and tricks. *Proceedings of the 5th European Veterinary Conference; 2007, Voorjaarsdagen. Voorjaarsdagen, Amsterdam: IVIS; 2007. p.213-5.*
15. Sirois J, Ball BA, Fortune JE. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the estrous cycle and after hemiovariectomy in mares. *Equine Vet J*. 1987;9 Suppl:43-8.
16. Squires EL. Embryo transfer. In: Mckinnon AO, Voss JL. *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p.357-67.
17. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Anim Reprod*. 2004;1:31-44.
18. Saltiel A, Calderon A, Garcia N, Hurley DP. Ovarian activity in the mare between latitude 15 and 22 N. *J Reprod Fertil*. 1982;32:261-7.
19. Brinsko SP, Varner DD. Artificial insemination. In: Mckinnon AO, Voss JL. *Equine reproduction*. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1992. p.790-7.
20. Arruda RP. Manejo reprodutivo das fêmeas equinas. In: *Anais da 13ª Semana de Zootecnia; 1990, Pirassununga. Campinas: Fundação Cargill; 1990. p.126.*
21. Mortensen CJ, Choi YH, Hinrichs K, Ing NH, Kraemer DC, Vogelsang SG. Embryo recovery from exercised mares. *Anim Reprod Sci*. 2009;110:237-44.
22. Kumar D, Jhamb D, Kumar N, Badial D. Foals born through fresh embryo transfer in India. In: *Proceedings of 10th International Congress of World Equine Veterinary Association; 2008, Moscow. Moscow, Russia: IVIS; 2008. p.567-8.*
23. Raz T, Carley S, Card C. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition *Theriogenology*. 2009;71:1358-66.
24. Araujo GHM, Rocha Filho AN, Lopes EP, Moya CF, Alvarenga MA. Use of a low dose to equine purified FSH to induce multiple ovulations in mares. *Reprod Domest Anim*. 2009;44:380-3.
25. Silva LA. Técnica ultra-sonográfica de injeção intrauterina para transferência de embriões em equinos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2003.
26. Iuliano MF. The effect of age of the equine embryo and method of transfer on pregnancy rate [thesis]. Fort Collins: Colorado State University; 1983.

27. Iulano MF, Squires EL, Cook VM. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. *J Anim Sci.*1985;60:258-63.
28. Mckinnon AO, Squires EL, Voss JL. Ultrasonic evaluation of the mare's reproductive tract. Part II. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1987;9:472-82.
29. Fleury JJ, Pinto AJ, Marques A, Lima CG, Arruda RP. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2001;38:29-33.
30. Davies Morel MCG, Newcombe JR, Swindlehurst JC. The effect of age on multiple ovulation rates, multiple pregnancy rates and embryonic vesicle diameter in the mare. *Theriogenology.* 2005;63:2482-93.
31. Sertich PL. Transcervical embryo transfer in performance mares. *J Am Vet Med Assoc.*1989;195:940-4.
32. Alvarenga MA, Mccue PM, Bruemmer J. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology.* 2001;56:879-87.

**Recebido em: 28/08/09**

**Aceito em: 25/05/12**

## VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE PARATORMÔNIO INTACTO EM CÃES

Luiz Henrique de Araújo Machado<sup>1</sup>  
Flávio Quaresma Moutinho<sup>2</sup>

### RESUMO

O presente trabalho objetivou testar o método da quimioluminescência para determinação do paratormônio (PTH) intacto em cães. Foi formado um grupo de estudo para estabelecer o padrão de normalidade da quimioluminescência em que foram utilizados 60 cães adultos saudáveis, sem distinção de sexo ou raça. Destes cães 66,7% apresentaram valores de PTH abaixo do limite de detecção do método demonstrando que este pode não ser eficiente.

**Palavras-chave:** cães; paratormônio; quimioluminescência.

### EVALUATION OF CHEMILUMINESCENT ASSAY ON DETERMINATION OF INTACT PARATHORMONE IN DOGS

#### ABSTRACT

The present study had the aim to test chemiluminescent assay on intact parathormone (PTH) determination in dogs. A study group of 60 healthy adult dogs, with no sex or breed distinction, was formed in order to establish a pattern of normality of chemiluminescence. Of these, 66,7% presented values of PTH below the limit of detection of the method, which demonstrates that this assay may not be efficient for the determination of intact PTH in dogs.

**Keywords:** dogs; parathormone; chemiluminescence.

### VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE QUIMIOLUMINISCENCIA PARA LA DETERMINACIÓN DE PARATHORMONA INTACTA EN PERROS

#### RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar el método de la quimioluminiscencia para la determinación de la parathormona (PTH) intacta en perros. Se formó un grupo de estudio para establecer el modelo de normalidad de la quimioluminiscencia formado por 60 perros adultos sanos, sin distinción de sexo o raza. De estos perros, el 66,7% presentó valores de PTH por debajo del límite de detección del método, demostrando que este puede no ser eficiente.

**Palabras clave:** perros; parathormona; quimioluminiscencia.

<sup>1</sup> Prof. Ass. Dr. do Depto. de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu, Distrito de Rubião Jr. S/N. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, henrique@fmvz.unesp.br, (14) 38802043. Autor para correspondência

<sup>2</sup> Prof. Dr. do Depto. de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu, Distrito de Rubião Jr. S/N. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, quaresma@fmvz.unesp.br, (14) 38116280

## INTRODUÇÃO

O paratormônio, polipeptídeo de cadeia simples, contendo 84 aminoácidos (1-4), atua no metabolismo de cálcio e fósforo facilitando a absorção destes nos intestinos, a reabsorção óssea de ambos e aumentando a reabsorção do cálcio, a excreção de fósforo e a produção de calcitriol nos rins (1, 3, 5-7).

A existência de três frações do hormônio, a amino-terminal [1-34], carboxi-terminal [39-84] e a fração intacta, foi demonstrada experimentalmente (8).

O hiperparatireoidismo é uma enfermidade metabólica caracterizada por uma osteodistrofia fibrosa generalizada (9-12) decorrente de reabsorção óssea e substituição do tecido ósseo por tecido conjuntivo fibroso (11, 13).

Existem duas formas de hiperparatireoidismo, a forma primária, decorrente de neoplasias nas paratireóides (14) e a secundária, que pode ser nutricional (11, 13, 15) ou decorrente de moléstias renais (11, 16, 17), sendo esta última a mais frequente.

As alterações características do hiperparatireoidismo secundário à moléstia renal (HSR) são hipocalcemia, hiperfosfatemia e aumento do PTH sérico com conseqüente alteração óssea como resposta (7, 17, 18).

A elevação do PTH no HSR se dá pela baixa concentração de calcitriol e pela hiperfosfatemia, que induzem a hipocalcemia pela formação de complexo Ca:P, fatores que levam a uma diminuição da retroalimentação negativa do PTH (6, 7). Com a progressão da doença ocorre resistência óssea ao PTH, sendo necessárias concentrações cada vez maiores do hormônio para manutenção dos níveis de cálcio, ocorrendo hiperplasia glandular (6, 7, 19-22).

Com a lesão renal ocorre um acúmulo das frações amino-terminal, intacta e, principalmente, da carboxi-terminal do PTH (2, 21). A fração amino-terminal, que é ativa, está aumentada de 2 a 10 vezes, enquanto a carboxi-terminal, biologicamente inativa, está aumentada de 50 a 200 vezes (2). A atividade das frações é medida pela capacidade de ativar a adenilciclase nos órgãos alvo, enzima que promove a conversão de ATP em AMP cíclico, desencadeando as ações celulares nos tecidos alvo (1, 2, 4, 23).

Os sinais clínicos do HSR são variados, incluindo osteodistrofia renal (1, 6, 20, 24, 25), calcificação de tecidos moles, anemia, hemorragias, intolerância à glicose, prurido, hiperlipidemia e disfunções sexuais (2, 7, 26), bem como necrose de tecidos moles em humanos com aumento do paratormônio (26).

O diagnóstico do HSR é baseado na concentração sérica elevada de PTH, associada a alterações renais e hiperfosfatemia (7, 17, 18).

O método analítico mais utilizado para mensuração do PTH sérico é o radioimunoensaio (RIA), utilizando o iodo radioativo [<sup>125</sup>I]. Originalmente desenvolvido para mensuração em humanos, foi padronizado para utilização em animais, com a utilização de anticorpo policlonal de ovelha. Vários testes foram estudados, levando em consideração o tipo de fragmento do PTH, podendo-se mensurar os fragmentos amino [1-34] ou carboxi-terminal [39-84] e o hormônio intacto (3, 27-31). Existe a opção pela mensuração do hormônio intacto como melhor forma de predizer a função das paratireóides por não levar em conta o aumento da fração N-terminal, que é inativa e está mais aumentada no HSR (30). Os valores normais relatados pelo método do radioimunoensaio são 17,8 mEq/mL (27), 10 a 30 pg/mL (3, 28, 31) e 14 a 34 pg/mL (29).

Atualmente estão sendo pesquisados outros métodos para serem utilizados como alternativa ao radioimunoensaio, sendo que os principais motivos são os fatores de segurança (32, 33) e o tempo de incubação (34). Um destes é o método da imunoquimioluminescência (ICMA), que demonstra boa correlação com o radioimunoensaio (30, 35), apresentando melhor sensibilidade do que o RIE (30) e pode ser utilizado em transoperatório, com apenas sete minutos de incubação, ao contrário do radioimunoensaio que possui tempo de incubação de 22 horas (34). Este método, já testado em humanos, possui dois anticorpos, o anti-PTH 1-

34 e o anti-PTH 44-84, porém a dosagem em caninos deve ser feita pelo uso de anti-PTH 1-34 e anti-PTH 39-84 (36).

O presente experimento teve por objetivos: determinar a especificidade e a eficiência do método da quimioluminescência para determinação dos valores normais de paratormônio intacto na espécie canina; determinar o valor normal do paratormônio intacto em cães pelo método da quimioluminescência e viabilizar o método da quimioluminescência para o diagnóstico do hiperparatireoidismo secundário à IRC, possibilitando ao clínico a escolha de uma forma mais simples e rápida de diagnóstico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Seleção e número de animais

Neste estudo foram utilizados 60 cães adultos, provenientes do canil do Biotério Central do Campus de Botucatu, escolhidos sem distinção de sexo ou raça e testados para descartar doenças que interfeririam no metabolismo de cálcio.

Foram excluídos os cães que apresentavam alterações da estrutura óssea e do metabolismo do cálcio, como: nefropatias, fraturas, neoplasias, hiperadrenocorticismos e terapia com drogas que pudessem interferir no estudo.

### Dosagem do PTH intacto sérico de cães sadios

O PTH intacto sérico [1-84] foi dosado utilizando-se a técnica de imunoquimioluminescência<sup>3</sup> com anticorpos específicos, anticorpo antiPTH 44-84 e antiPTH 1-34, medindo imunocomplexos, após incubação, pela luminescência produzida pela reação química.

A precisão intra-ensaio foi determinada pela repetição de 10 % das amostras da seguinte forma, a cada dez ensaios repetiu-se o décimo.

### Análise Estatística

Para a variável observada no experimento foram apresentadas as estatísticas descritivas de média e desvio padrão amostral, a variação dos valores dos testes intra-ensaio não foi superior a 5%.

## RESULTADOS

### Paratormônio intacto dos animais sadios

Os valores encontrados apresentaram variação entre <1 e 7,4 pg/mL (Tabela 1). Em 66,7% dos animais os valores encontravam-se abaixo do valor mínimo de detecção do método (<1 pg/mL).

---

<sup>3</sup> Immulite intact PTH® - DPC

Tabela 1. Valores de PTH intacto dos animais sadios

Animal	PTH (pg/mL)	Animal	PTH (pg/mL)
1	<1	31	<1
2	<1	32	<1
3	<1	33	<1
4	<1	34	<1
5	<1	35	<1
6	4.6	36	<1
7	2.1	37	<1
8	<1	38	1.5
9	<1	39	<1
10	2.5	40	<1
11	7.0	41	4.6
12	<1	42	3.1
13	<1	43	2.1
14	<1	44	<1
15	1.5	45	<1
16	<1	46	<1
17	1.4	47	<1
18	<1	48	<1
19	<1	49	<1
20	<1	50	7.1
21	<1	51	2.6
22	<1	52	<1
23	<1	53	2.3
24	<1	54	7.4
25	<1	55	<1
26	<1	56	<1
27	2.3	57	4.1
28	<1	58	1.7
29	6.9	59	<1
30	4.9	60	5.3

## DISCUSSÃO

Atualmente com a melhora dos cuidados com os animais domésticos e o desenvolvimento da Medicina Veterinária, torna-se necessário um aprofundamento no estudo das doenças e estabelecimento de rotina clínica e laboratorial para o diagnóstico destas.

A literatura (32-34) sugere que, devido ao aumento das exigências em biossegurança, se pesquise métodos laboratoriais mais seguros que o radioimunoensaio e com tempo de incubação menor.

Um dos objetivos deste estudo foi testar o método da imunoquimioluminescência, também chamado de quimioluminescência como alternativa ao radioimunoensaio para dosagens de PTH intacto em cães e determinar o intervalo de valores normais por este método. Na medicina (30, 35) este teste está bem fundamentado, apresentando maior sensibilidade que o radioimunoensaio.

No grupo dos cães normais, os valores de PTH intacto encontrados variaram de <1 a 7,4 pg/mL, com 66,7% dos animais apresentando valores abaixo do limite mínimo de detecção do método. Os resultados encontrados demonstram que este método pode não ser eficiente para determinações de valores de PTH intacto em animais com alterações que levem à diminuição da concentração do hormônio, pois corre-se o risco de se obter um valor abaixo do limite do

método. Existe a probabilidade deste método não ter sido eficiente para valores normais por se tratar de um kit composto de dois anticorpos, o anti-PTH 1-34 e o anti-PTH 44-84, o que segundo Feldman (36) não é o ideal para a dosagem em caninos, que deve ser feita pelo uso de anti-PTH 1-34 e anti-PTH 39-84, porém não há no mercado um kit com estas características.

Neste estudo pôde-se testar o método da quimioluminescência como forma de diagnóstico de alterações das paratireóides em substituição ao radioimunoensaio. Mais estudos se fazem necessários para determinar se o método é eficiente ou se existem problemas com as frações de anticorpo utilizados neste kit em especial.

## CONCLUSÕES

Os valores de PTH intacto encontrados nos cães sadios utilizados neste estudo demonstram que o método da quimioluminescência pelo kit utilizado pode não apresentar a eficiência necessária para que seja adotado rotineiramente na mensuração de valores normais ou diminuídos do PTH em cães.

## REFERÊNCIAS

1. Capen CC, Martin SL. Calcium metabolism and disorders of parathyroid glands. *Vet Clin North Am.* 1977;7:513-48.
2. Klahr S, Slatopolsky E. Toxicity of parathyroid hormone in uremia. *Annu Rev Med.* 1986;37:71-8.
3. Rosol TJ, Capen CC. Pathophysiology of calcium, phosphorus, and magnesium metabolism in animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1996;26:1155-84.
4. Slatopolsky E, Martin K, Hruska K. Parathyroid hormone metabolism and its potential as a uremic toxin. *Am J Physiol.* 1980;239:F1-12.
5. Banks WJ. Sistema endócrino. In: *Histologia veterinária aplicada*. 2aed. São Paulo: Manole; 1992. cap. 25, p.521-45.
6. Chew DJ, Dibartola SP. Diagnóstico e fisiopatologia da moléstia renal. In: *Ettinger EJ. Tratado de medicina interna veterinária*. 3ªed. São Paulo: Manole; 1992. v.4, cap.107, p.1975-2046.
7. Yaphé W, Forrester SD. Renal secondary hyperparathyroidism: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Comp Cont Educ Pract Vet.* 1994;16:173-81.
8. Silverman R, Yalow RS. Heterogeneity of parathyroid hormone clinical and physiologic implications. *J Clin Invest.* 1973;52:1958-71.
9. Albright F, Reifenstein EC. *The parathyroid glands and metabolic bone disease*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1948.
10. Itakura C, Iida M, Goto M. Renal secondary hyperparathyroidism in aged sprague-dawley rats. *Vet Pathol.* 1977;14:463-9.

11. Lúcio WF, Nogueira RMR, Silva JML, Mello MA, Carvalho CB. Hiperparatireoidismo secundário renal em cão. *Arq Esc Vet Univ Fed Minas Gerais*. 1973;25:59-66.
12. Mclean FC, Urist MR. *Bone fundamentals of the physiology of skeletal tissue*. 3ª ed. Chicago: University of Chicago; 1968.
13. Lamb CR. The double cortical line: a sign of osteopenia. *J Small Anim Pract*. 1990;31:189-92.
14. Kirk RW. *Current veterinary therapy III small animal practice*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1968.
15. Weller RE, Cullen J, Dagle GE. hyperparathyroid disorders in the dog: primary, secondary and cancer-associated (pseudo). *J Small Anim Pract*. 1985;26:329-41.
16. Watson ADJ, Canfield PJ. Renal failure, hyperparathyroidism and hypercalcaemia in a dog. *Aust Vet J*. 1979;55:177-80.
17. Weller RE, Cliver S. Renal secondary hyperparathyroidism. *Mod Vet Pract*. 1981;62:117-20.
18. Werner LL. Renal secondary hyperparathyroidism, fibrous osteodystrophy, and hypocalcemia in a young dog with end-stage kidney disease. *Comp Cont Educ Pract Vet*. 1983;5:195-202.
19. Massry SG, Arief AI, Coburn JW, Palmieri G, Kleeman CR. Divalent ion metabolism in patients with acute renal failure: Studies on the mechanism of hypocalcemia. *Kidney Int*. 1974;5:437-45.
20. Slatopolsky E, Rutherford E, Hruska K, Martin K, Klahr S. How important is phosphate in the pathogenesis of renal osteodystrophy? *Arch Intern Med*. 1978;138:848-52.
21. Lopez-Hilker S, Galceran T, Chan YL, Rapp N, Martin KJ, Slatopolsky E. Hypocalcemia may not be essential for the development of secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure. *J Clin Invest*. 1986;78:1097-102.
22. Galceran T, Martin KJ, Morrissey JJ, Slatopolsky E. Role of 1,25-dihydroxyvitamin D on the skeletal resistance to parathyroid hormone. *Kidney Int*. 1987;32:801-7.
23. Nissenson RA, Abbott SR, Teitelbaum AP, Arnaud CD. Endogenous biologically active human parathyroid hormone: measurement by a guanyl nucleotide-amplified renal adenylate cyclase assay. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981;52:840-6.
24. Barber PJ, Elliott J. Feline chronic renal failure: calcium homeostasis in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. *J Small Anim Pract*. 1998;39:108-16.
25. Bricker NS, Fine LG. The trade-off hypothesis: current status. *Kidney Int Suppl*. 1978;13:5-8.
26. Massry SG, Goldstein DA. The search for uremic toxin(s) "X" "X" = PTH. *Clin Nephrol*. 1979;11:181-9.

27. Akmal M, Telfer N, Ansari AN, Massry SG. Erythrocyte survival in chronic renal failure. *J Clin Invest.* 1985;76:1695-8.
28. Hansen BH, DiBartola SP, Chew DJ, Brownie C, Nagode L. Clinical and metabolic findings in dogs with chronic renal failure fed two diets. *Am J Vet Res.* 1992;53:326-34.
29. King LG, Giger U, Diserens D, Nagode LA. Anemia of chronic renal failure in dogs. *J Vet Intern Med.* 1992;6:264-70.
30. Morita A, Tabata T, Koyama H, Emoto M, Inoue T, Nishizawa Y, et al. A two-site immunochemiluminometric assay for intact parathyroid hormone and its clinical utility in hemodialysis patients. *Clin Nephrol.* 1992;38:154-7.
31. Petrites-Murphy MB, Pierce KR, Lowry SR, Fischer JW. Role of parathyroid hormone in the anemia of chronic terminal renal dysfunction in dogs. *Am J Vet Res.* 1989;50:1898-905.
32. Lazaretti P, Kogika MM, Hagiwara MK, Lustoza MD, Mirandola RMS. Concentração sérica de paratormônio intacto em cães com insuficiência renal crônica. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2006;58:489-94.
33. Jericó MM, Mendonça BB, Otsuka M, Maganin JRA, Larsson CE. Avaliação da função tireóidea na espécie canina: padronização e comparação entre imunoensaios. In: *Anais do 20º Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; 1999, Águas de Lindóia. Águas de Lindóia: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; 1999. p.19.*
34. Garner SC, Leigh GS. Initial experience with intraoperative PTH determinations in the surgical management of 130 consecutive cases of primary hyperparathyroidism. *Surgery.* 1999;126:1132-8.
35. Exner T, Koutts J. Simple immunochromometric assay for protein C activity. *J Lab Clin Med.* 1986;107:405-11.
36. Feldman EC. The parathyroid gland. In: *Feldman EC, Nelson RW. Canine and feline endocrinology and reproduction. 2ªed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. cap.14, p. 454-516.*

**Recebido em: 16/06/08**

**Aceito em: 31/10/12**

## SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS EM PASTAGENS DE CAPIM XARAÉS NO PERÍODO DAS ÁGUAS

Daniel Marino Guedes de Carvalho<sup>1</sup>  
Luciano da Silva Cabral<sup>2</sup>  
Janaina Januario da Silva<sup>2</sup>  
Renato Esteves Sandri<sup>3</sup>  
Ricardo Alessandro Baez Gomes<sup>3</sup>  
Moises Zorzeto Neto<sup>3</sup>  
Aristóteles de Jesus Teixeira Filho<sup>1</sup>

### RESUMO

Objetivou-se avaliar suplementos energético e múltiplo fornecidos em quantidades de 2 e 4 kg animal dia, além da mistura mineral, sobre o desempenho produtivo e custos da produção leiteira, durante o período das águas. O experimento foi conduzido em área experimental constituída por cinco piquetes de 0,45 ha, formados com o capim Xaraés, e providos de bebedouros e cochos cobertos com duração de cinco períodos de 14 dias, totalizando 70 dias experimentais. Foram utilizadas cinco vacas Girolando no terço médio de lactação, com aproximadamente seis anos de idade e peso corporal médio de 460 kg, distribuídas aleatoriamente em um delineamento quadrado latino 5x5. O leite foi pesado nos 12º, 13º e 14º dias de cada período experimental após as ordenhas da manhã e tarde para mensuração do desempenho dos animais. Não houve efeito da suplementação sobre a produção de leite ( $P>0,05$ ), sendo a produção media diária de 8,21 kg leite animal dia. As margens brutas por kg de leite produzido para os suplementos utilizados foram de 0,54; 0,43; 0,38; 0,40 e 0,32 respectivamente para os suplementos mistura mineral, energético fornecido a 2 e 4 kg e múltiplo fornecido a 2 e 4 kg animal dia.

**Palavras-chave:** capim brachiaria, energia, leite a pasto, proteína.

### SUPPLEMENTATION FOR DAIRY CATTLE IN XARAÉS GRASS PASTURE IN RAINY SEASON

#### ABSTRACT

The present work aimed to evaluate energy and multiple supplements supplied to 2 and 4 kg animal day, in addition to mineral mix, on the performance and costs of milk production during the rainy season. The experiment was conducted in the experimental area consisted of five paddocks of 0.45 ha, with the Xaraés grass, and equipped with water and supplements dispenser covered, with a duration of five periods of 14 days, with 70 experimental days. Five Girolando dairy cows were used, with approximately six years of age and body weight of 460 kg randomly divided into a 5x5 Latin square design. After milking, the milk was weighed at 12, 13 and 14 days of each experimental period after the morning and afternoon milking to measure the performance of animals. There was no effect of supplementation on milk production ( $P> 0.05$ ), have been observed the average of 8.21 kg milk animal day. Gross

<sup>1</sup> Professor Doutor, Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia; Estrada Macurany nº 1805; Bairro: Jacareacanga, 69152-240, Parintins – AM (danielguedes14@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Professor Doutor, Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina veterinária e Zootecnia, Programas de pós graduação em Agricultura tropical e Ciência animal. Avenida Fernando Correia da costa nº 2367; Bairro: Boa esperança, Cep: 78.060-900, Cuiabá – MT, (cabralls@ufmt.br; janajanu@jotmail.com)

<sup>3</sup> Graduação em Agronomia, Universidade de Cuiabá, Faculdade de Agronomia, Avenida Beira Rio, S/N, Cep:78.800-000, Cuiabá-MT (baez@gmail.com; zorzeto@hotmail.com; sandri@hotmail.com)

margins per kg milk produced for the supplements used were 0.54, 0.43, 0.38, 0.40 and 0.32 respectively for mixing mineral supplements, energy supplied to 2 and 4 kg, and provided multiple at 2 and 4 kg animal day.

**Keywords:** palisade grass, energy, grass milk, protein.

## SUPLEMENTACIÓN DE VACAS LECHERAS MANTENIDAS EN PASTO XARAÉS DURANTE EL PERIODO DE LLUVIAS

### RESUMEN

El objetivo fue evaluar el rendimiento y los costos de producción de la leche durante la estación de lluvias utilizando suplementos energéticos y suplementos variados en cantidades de 2 y 4 kg animal-1 día, además de mezcla de minerales. El experimento se llevó a cabo en cinco potreros de 0,45 ha, plantados con pasto Xaraés y equipados con bebederos y comederos cubiertos y fue realizado en cinco periodos de 14 días, (total de 70 días). Fueron utilizadas cinco vacas de raza Girolando durante el segundo tercio de lactancia, con aproximadamente seis años de edad y peso corporal de 460 kg, distribuidas aleatoriamente en un cuadrado latino 5x5. La leche se pesó en los días 12, 13 y 14 de cada período experimental después de la ordeña matutina y vespertina para evaluar el rendimiento de los animales. No hubo efecto de los suplementos sobre la producción de leche ( $P > 0,05$ ). La producción media de leche fue de 8.21 kg por día. Los márgenes brutos por kilogramo de leche producida para cada uno de los suplementos utilizados fueron de 0.54, 0.43, 0.38, 0.40 y 0.32, para la mezcla de minerales, suplemento energético administrado a 2 y 4 kg y suplemento variado proporcionado a 2 y 4 kg animal día-1, respectivamente.

**Palavras chave:** pasto brachiaria, energía, leche a pasto, proteína

### INTRODUÇÃO

O crescimento da produção de leite no Brasil nos últimos anos têm sido bastante significativo, enquanto o consumo interno tem se expandido em ritmo mais lento (1). Atualmente, nota-se tendência para produção de leite a pasto, objetivando à diminuição dos custos de produção, devido principalmente ao elevado preço do concentrado (2), no entanto a inclusão de pequenas quantidades de suplementos pode ter efeito positivo na utilização da forragem disponível mesmo em pastagens de alta qualidade no período das águas (3).

Considerando que é o principal fator limitante da produção animal, o consumo restrito (quantidade e, ou, qualidade) de nutrientes só será controlado pelo valor nutritivo se a quantidade disponível de forragem não for limitante (4). Trabalhos de pesquisa têm demonstrado que mesmo em pastagens com alta disponibilidade de forragem no período das águas existe resposta a suplementação de animais em pastejo apesar da menor magnitude desta (5-7).

Para Minson (8) quando a forragem tem acima de 7,0% de proteína bruta (PB) é garantido suprimento de nitrogênio para que os carboidratos fibrosos da dieta sejam utilizados de maneira adequada. No entanto, para Paulino, Detmann e Valadares Filho (3, 9) a maximização da utilização da fibra em detergente neutro potencialmente digestível (FDNpD) de forragens tropicais acontece quando a dieta basal possui 10,0% de PB.

Segundo Costa et al. (10) em estudos *in vitro*, a suplementação, nos casos de alimentação com forragem de alta qualidade, de forma exclusiva com caseína (proteína verdadeira) ou carboidratos (amido ou pectina) pode ter efeitos deletérios na degradação dos carboidratos fibrosos da forragem, porém a suplementação conjunta com proteína e

carboidratos permite a redução dos efeitos deletérios em comparação à suplementação isolada com esses compostos. Dessa forma, a utilização de suplementos com características múltiplas pode não atrapalhar a utilização da forragem com vistas a melhoria do desempenho animal.

Em sistemas de produção de animais a pasto, a inclusão suplementos deve ser feita de forma criteriosa, não apenas levando em consideração aspectos técnicos, mas também os econômicos, com vistas a atingir as metas produtivas com mínimo custo e máxima eficiência econômica. Objetivou-se avaliar a suplementação mineral, energética e múltipla sobre o desempenho e custo de produção de vacas leiteiras mantidas em pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés com alta disponibilidade de forragem no período das águas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas dependências da Chácara Capão Grande, localizada a 20 km de Cuiabá, no município de Várzea Grande - MT, na região da Baixada Cuiabana, com início em 05 de Janeiro e término em 20 de Março de 2010, correspondendo ao período das águas, com total de 70 dias experimentais, divididos em cinco períodos de 14 dias.

A área destinada aos animais foi constituída por cinco piquetes de 0,45 ha cada, formados com a gramínea *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, providos de bebedouros e cochos cobertos. Utilizou-se cinco vacas Giroloando, com seis anos de idade e peso corporal médio de 460 kg, aproximadamente quatro meses após o parto. Foram usados os seguintes suplementos:

- Mistura mineral (MM) fornecida *ad libitum*;
- Suplemento energético (SE) fornecido a 2 e 4 kg animal dia;
- Suplemento múltiplo (SM) fornecido a 2 e 4 kg animal dia;

Todos os animais foram submetidos ao controle de ecto e endoparasitas no início e meio do experimento. A composição percentual dos suplementos com base na matéria natural e os custos dos ingredientes encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual dos suplementos com base na matéria natural e custo dos ingredientes usados na formulação.

Ingrediente	Valores		Suplementos		
	R\$/ton	R\$/kg	MM	SE	SP
Farelo de soja	750,00	0,75	-	-	10,00
Resíduo de pré-limpeza de milho <sup>2</sup>	150,00	0,15	-	92,40	80,00
Uréia+Sulfato de Amônia (9:1)	1.800,00	1,80	-	2,60	5,00
Mistura mineral <sup>1</sup>	1.150,00	1,15	100,00	5,00	5,00

<sup>1</sup>Mistura mineral comercial para vacas em lactação. Níveis de garantia por kg de produto: Cálcio: 200g; Fósforo: 100g; Sódio: 68g; Magnésio: 15g; Enxofre: 12g; Cobalto: 200mg; Cobre: 1650mg; Iodo: 195mg; Manganês: 1960mg; Níquel: 40mg; Selênio: 32mg; Zinco: 6285mg; Ferro: 560mg; Flúor (max.): 1000mg; <sup>2</sup>Resíduo oriundo de peneiras de limpeza dos grãos de milho nos armazéns secadores, composto por grãos de milho quebrados (70 a 80%) e impurezas (20 a 30%).

Os suplementos foram fornecidos duas vezes ao dia em porções iguais, após as ordenhas (06:00 e 16:00 horas), segundo esquema de fornecimento demonstrado na Tabela 2, monitorando-se as possíveis sobras de suplementos

Tabela 2. Esquema de distribuição dos suplementos

Esquema de fornecimento	Níveis de fornecimento (kg)				
	MM	SE 2 kg	SE 4 kg	SP 2 kg	SP 4 kg
Manhã	<i>Ad libitum</i>	1,0	2,0	1,0	2,0
Tarde	<i>Ad libitum</i>	1,0	2,0	1,0	2,0
Total	<i>Ad libitum</i>	2,0	4,0	2,0	4,0

Os animais foram ordenhados mecanicamente, às 06:00 e 16:00 horas diariamente. Os 11 primeiros dias de cada período experimental foram destinados a adaptação dos animais aos suplementos, sendo feitas as mensurações nas quantidades de leite produzido no 12º, 13º e 14º dias. Para medir a produção de leite por animal, foi usada uma balança digital. Depois de ordenhado o animal, o leite era pesado e descontado o peso do balde.

No primeiro dia do primeiro, terceiro e quinto períodos experimentais realizou-se a coleta de amostras da forragem nos diferentes piquetes. Para esta amostragem foram realizadas medições da altura da forragem em 100 pontos por piquete, divididos em duas diagonais (50 pontos por diagonal). Após a medição os valores foram somados para obtenção de uma altura média da forragem por piquete e coletada a forragem a 5 cm do solo com um quadrado metálico de 1m<sup>2</sup> em um ponto do piquete que cuja altura fosse igual a média obtida pela medição. Após a coleta, as amostras de cada piquete foram pesadas e homogêneas, e à partir dessas retiraram-se duas alíquotas compostas: uma para avaliação da disponibilidade total de matéria seca total de forragem (kg/ha) e outra para análise das disponibilidades por hectare de MS de: folha verde, folha seca, colmo verde e colmo seco.

A avaliação da forragem ingerida pelos animais foi realizada utilizando a técnica da simulação manual de pastejo (11), coletando-se amostras de pasto em duas linhas diagonais dentro de cada piquete no primeiro dia de cada período experimental, procurando manter sempre os mesmos amostradores, com vistas à diminuição na variabilidade dos resultados.

Todo o material coletado foi imediatamente congelado em freezer a -20 °C para posterior análise laboratorial. Também foram feitas amostragens dos ingredientes usados para a formulação do suplemento e dos suplementos após misturados.

As amostras dos ingredientes, suplementos e forragem foram analisadas no laboratório de Bromatologia da Universidade de Cuiabá (UNIC), para as seguintes variáveis: matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), cinzas (CZ), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) realizadas de acordo com as técnicas descritas por Silva e Queiroz (12). As concentrações de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) foram determinadas por intermédio da digestibilidade *in situ*, obtida após incubação por 144 horas, segundo o método descrito por Cochran et al. (13). Os carboidratos totais (CT) foram obtidos pela equação proposta por Sniffen et al. (14):  $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%Cinzas)$ . Os carboidratos totais (CT) dos suplementos foram obtidos pela equação proposta por Hall (15):  $CNF = 100 - [(\%PB - \%PBuréia + \%uréia) + \%FDN + \%EE + \%MM]$ . Os carboidratos não-fibrosos (CNF), pela diferença entre CT e FDN.

Para a avaliação econômica, o valor atribuído a tonelada de cada ingrediente foi obtido por cotação de preço no mercado local em três fornecedores. O custo dos suplementos foi calculado em função do nível de inclusão de cada ingrediente multiplicado pelo seu respectivo preço por unidade de produto (kg). O custo por dia com suplemento (R\$) foi calculado multiplicando-se o consumo de suplemento animal/dia pelo preço por kg de suplemento. Para o custo com forragem foi considerado o valor de aluguel de pasto de R\$ 10,00 animal/mês. O custo diário total foi obtido pela soma dos custos diários com mão de obra, forragem e suplemento. Para calcular o custo da mão de obra, assumiu-se a contratação de um funcionário com capacidade para cuidar de 50 vacas leiteiras com produção média de 10 kg

de leite vaca dia, sendo a sua remuneração mensal de R\$ 1.000,00. Foram considerados os mesmos custos com mão-de-obra para os suplementos SE e SM, pois estes suplementos foram fornecidos diariamente. Já para MM (mistura mineral) assumiu-se frequência semanal de reabastecimento dos cochos. A margem bruta por kg de leite foi calculada pela diferença entre o valor pago por kg de produto e o custo diário total para que o animal produzisse esse kg de leite.

As análises estatísticas foram conduzidas em um delineamento quadrado latino 5x5, segundo o modelo estatístico:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + \beta_j + P_k + \varepsilon_{ijk}$$

em que:

$\mu$  = constante geral;

$\alpha_i$  = efeito do suplemento i (i = 1, 2, 3, 4 e 5);

$\beta_j$  = efeito referente ao animal ou sequência de tratamentos j (j = 1, 2, 3, 4 e 5);

$P_k$  = efeito referente ao período experimental k (k = 1, 2, 3, 4 e 5); e

$\varepsilon_{ij}$  = erro aleatório, associado a cada observação, pressuposto NID (0,  $\sigma^2$ ).

Os dados foram analisados por meio de análise de variância e para comparação entre as médias utilizou-se o teste de SNK, sendo todas as análises realizadas por intermédio do programa Saeg - UFV (16), tendo-se adotado o nível de probabilidade de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados valores médios de massa de forragem total (MSFT), de lâminas foliares verdes (MSLV), de lâminas foliares mortas (MSLM), de colmos verdes (MSCV) e de colmos mortos (MSCM) na pastagem de 4.660; 1.920; 520; 1.710 e 520 kg ha, respectivamente (Figura 1). O comportamento dos dados de disponibilidade encontrado está de acordo com os observados por Paula et al. (17), em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com aumento MSCV e diminuição da MSLV em função do pastejo animal. Segundo Euclides et al. (18), no caso de pastagens tropicais, onde há um grande acúmulo de material senescente, a pressão de pastejo deve ser expressa em massa de forragem verde e especialmente como lâminas foliares verdes, pois não há relação entre o desempenho animal e produção por hectare quando a pressão de pastejo é calculada com base na massa seca total de forragem (MST), mas é positiva com o cálculo em matéria seca verde (MSV). De fato, quando disponível, o animal tende a selecionar apenas folhas verdes e a recusar as folhas secas e os colmos.

Foram observados valores médios para ofertas de massa de forragem total (OMSFT), de lâminas foliares verdes (OMSLV), de lâminas foliares mortas (OMSLM), de colmos verdes (OMSCV) e de colmos mortos (OMSCM) na pastagem de 26,64; 8,23; 2,43; 7,70 e 2,56% do peso corporal (PC), respectivamente (Figura 2).

Para este experimento o valor encontrado para OMSFT de 9,97 vezes a capacidade de ingestão dos animais demonstra a alta oportunidade dos animais selecionarem folhas verdes na tentativa de consumir uma dieta mais adequada a suas necessidades nutricionais. Pela análise de extrusa, Euclides et al. (18) observaram que, mesmo com a baixa disponibilidade de MS nas pastagens, durante todo o ano, a participação de folhas na dieta selecionada pelo animal foi superior a 84% e a quantidade de material morto correspondeu a apenas pequena proporção da dieta, variando de 5 a 10%, o que permite dizer que na condição desse experimento, onde a oferta de forragem é alta os animais puderam praticar a seleção de folhas verdes durante o processo de pastejo a busca de consumir uma dieta mais adequada as suas exigências nutricionais.

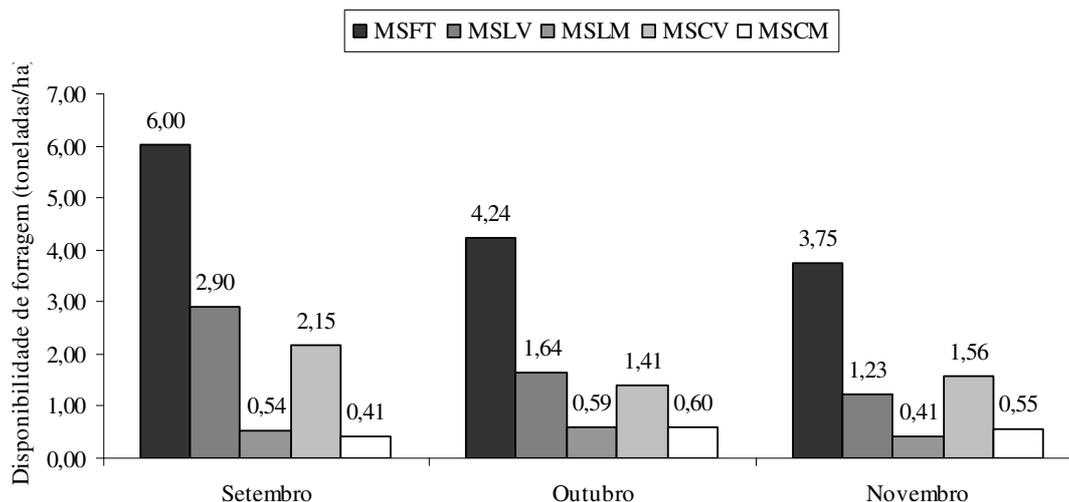


Figura 1. Massa seca de forragem total (MSFT), de lamina foliares verdes (MSLFV), de laminas foliares mortas (MSLFM), de colmos verdes (MSCV) e de colmos mortos (MSCM) do capim Marandu em cada período experimental.

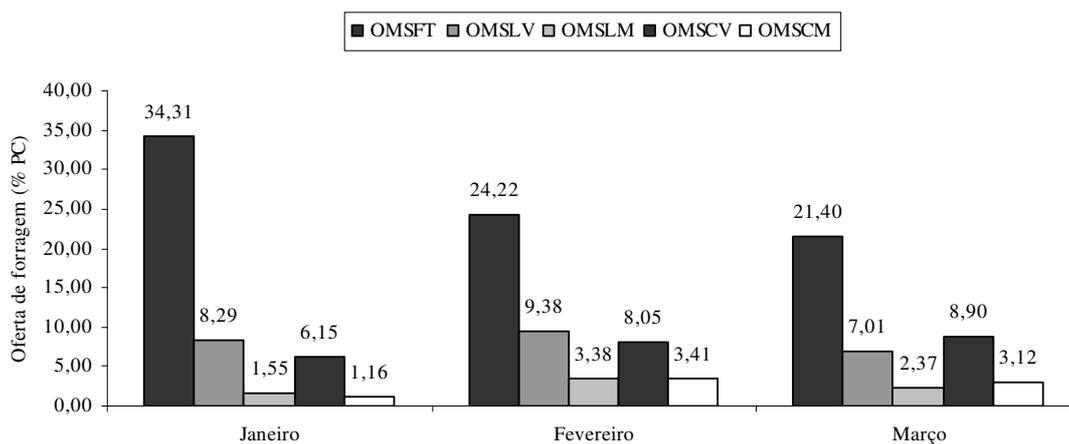


Figura 2. Ofertas diárias de massa seca de forragem total (OMSFT), de lamina foliares verdes (OMSLFV), de laminas foliares mortas (OMSLFM), de colmos verdes (OMSCV) e de colmos mortos (OMSCM) do capim Marandu em cada período experimental em porcentagem do peso corporal dos animais.

A forragem disponível ao pastejo animal possuía em media 7,48% de PB (Tabela 3), acima de 7,00% considerados por Minson (8) como adequados a fermentação dos carboidratos estruturais da forragem e abaixo de 10,00% de PB citados por Detmann, Paulino e Valadares Filho (3) como valor a partir do qual a fibra em detergente neutro potencialmente digestível é otimizada e/ou maximizada.

O teor médio de FDN encontrado para forragem no presente estudo foi de 73,70%, estão próximos aos encontrados por Zervoudakis et al. (19) de 69,80% em amostras de capim marandu obtidas via extrusa esofágica e superior ao encontrado por Zervoudakis et al. (20) e Porto et al. (21) 66,62 e 66,82 em amostras obtidas via extrusa esofágica. A diferença no teor de proteína bruta entre os suplementos SE e SM (Tabela 4) são devidas à diferença na combinação dos ingredientes utilizados em cada uma das formulações (Tabela 1).

Tabela 3. Composição Bromatológica da Forragem com base na matéria seca

Itens	Meses experimentais			Média
	Janeiro	Fevereiro	Março	
MS (%)	29,32	28,98	31,33	29,87
MO	93,52	94,19	93,50	93,74
PB	7,88	7,30	7,26	7,48
EE	1,22	1,55	1,32	1,36
FDN	70,92	73,38	76,81	73,70
FDNi	21,43	19,29	23,18	21,30
MM	6,48	5,81	6,50	6,26
CT	83,42	86,34	84,92	83,23
CNF	13,51	12,97	8,11	9,53

matéria seca (MS%), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), extrato etéreo (EE), carboidratos totais (CHOT), carboidratos não fibrosos (CNF)

Tabela 4. Composição bromatológica dos ingredientes e suplementos com base na matéria seca

Itens	Ingredientes e suplementos			
	Farelo de soja	Resíduo de milho	SE	SM
MS (%)	90,32	91,37	92,85	91,45
MO	94,53	98,47	92,84	93,70
PB	50,67	7,93	17,45	27,66
FDN	21,43	27,41	8,80	12,61
EE	3,96	2,23	1,85	2,11
CZ	5,47	1,53	7,16	6,30
FDNi	5,65	7,82	7,32	7,96
CT	39,90	88,31	73,58	63,93
CNF	18,47	60,90	64,78	51,32

Matéria seca (MS%), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), cinzas (CZ), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), extrato etéreo (EE), carboidratos totais (CT), carboidratos não fibrosos (CNF)

O suplemento SM tem 10,00% de farelo de soja (50,67% de PB) e 5,00% de uréia com sulfato de amônia (9:1) respectivamente, que por serem ingredientes com maior teor protéico ajudam a aumentar a quantidade de PB de SM em relação a SE, que é composto por 92,40% de resíduo de pré-limpeza de milho (10,93% de PB) e 2,60% de uréia com sulfato de amônia (9:1) respectivamente.

Não houve diferença entre os suplementos ou níveis utilizados ( $P < 0,05$ ) para a produção de leite (Tabela 5). As produções médias animal dia foram de: 8,08; 8,37; 8,54; 7,93 e 8,12 kg respectivamente para mistura mineral (MM), suplemento energético (SE) fornecido a 2 e 4 kg e suplemento múltiplo (SM) fornecido a 2 e 4 kg.

Tabela 5. Produção de leite por dia animal e por hectare

Item	Suplementos				
	MM	SE		SM	
		2 kg	4 kg	2 kg	4 kg
Produção de leite (kg animal dia)	8,08 <sup>a</sup>	8,37 <sup>a</sup>	8,54 <sup>a</sup>	7,93 <sup>a</sup>	8,12 <sup>a</sup>
Conversão do suplemento em leite (kg/kg)	-	4,185	2,135	3,965	2,030
Produção de leite (kg animal mês) <sup>1</sup>	242,40	251,10	256,20	237,90	243,60
Produção de leite (ha dia)	16,16	16,74	17,08	15,86	16,24
Produção de leite (ha mês) <sup>1</sup>	484,80	502,20	512,40	475,80	487,20

Letras iguais na linha não diferem pelo teste de SNK a 5% de probabilidade; <sup>1</sup>Mês=30 dias.

Semmelmann et al. (22) fornecendo suplemento energético (9,0% de PB) e energético – protéico (20,0% de PB) na proporção de 1,0 kg de suplemento para cada 3,0 litros de leite produzido, para vacas leiteiras Holandesas em pastagens de Capim-quicuí com 15,80% de PB, não observaram diferença na produção de leite, sendo as médias encontradas de 15,67 e 15,66 kg animal dia respectivamente para os suplementos energéticos e energético – protéico.

Nesse sentido, o fornecimento dos suplementos SE e SM a 2 kg animal dia para este estudo são próximos aos citados por Semmelmann et al. (22) considerando a relação 1,0 kg de suplemento para cada 3,0 kg de leite produzido, descrita para fornecimento de suplemento.

Pimentel et al. (6) suplementando vacas em pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com 7,80% de PB com mistura mineral e suplementos com 50, 30 e 20% de PB fornecidos a 2,0; 3,5 e 5,0 kg animal dia encontraram efeito quadrático ( $P > 0,057$ ) da suplementação sobre a produção de leite sendo as produções médias de 10,20; 12,10; 14,20 e 13,40 para mistura mineral e suplementos com 50, 30 e 20% de PB respectivamente. Estes autores atribuíram esse desempenho ao efeito associativo positivo entre a forragem e os menores níveis de suplementação com teores mais elevados de PB. Os resultados de Pimentel et al. (6) contrariam os resultados encontrados nesse experimento em que mesmo com uso de suplementos com maiores teores de PB em menores níveis de fornecimento, como no caso do suplemento SM fornecido a 2,0 kg animal dia que não difere dos outros tratamentos utilizados.

Apesar do maior custo por tonelada de suplemento apresentado pela mistura mineral, esta obteve margem bruta de R\$ 0,54, sendo superior aos outros suplementos e níveis aqui avaliados. Este resultado deve-se ao seu baixo consumo pelos animais (0,100 kg animal dia) e a produção de leite que não sofreu alteração em função dos suplementos e níveis utilizados e ao baixo custo com mão de obra empregado nesse tipo suplemento, pois o seu fornecimento é feito semanalmente.

Tabela 6. Indicadores econômicos de produção

Indicadores Econômicos	Suplementos				
	MM	SE/2kg	SE/4kg	SP/2kg	SP/4kg
Custo Suplemento (R\$/ton)	1.150,00	242,90	242,90	342,50	342,50
Custo suplemento (R\$/kg)	1,15	0,24	0,24	0,34	0,34
Consumo suplemento (kg/dia)	0,100	2,000	4,000	2,000	4,000
Custo diário com suplemento (R\$)	0,12	0,49	0,97	0,69	1,37
Custo diário com forragem (R\$/dia)	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
Custo com mão de obra (R\$/dia)	0,09	0,66	0,66	0,66	0,66
Custo diário total (R\$)	0,54	1,48	1,96	1,68	2,36
Produção de leite (kg/dia)	8,08	8,37	8,54	7,93	8,12
Valor pago pelo leite (R\$/kg)	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
Receita (R\$/dia) <sup>2</sup>	4,93	5,11	5,21	4,84	4,95
Margem Bruta diária <sup>1</sup>	4,39	3,63	3,25	3,16	2,59
Margem Bruta por kg de leite <sup>1</sup>	0,54	0,43	0,38	0,40	0,32

<sup>1</sup>Margem bruta=Receita diária – custo diário; <sup>2</sup>Receita=Produção (kg/animal/dia)\*Valor pago pelo leite (R\$/kg)

A melhor margem bruta obtida entre os tratamentos suplementados para o suplemento SE fornecido a 2 kg animal dia deve-se ao fato de este suplemento apresentar um custo por kg de produto inferior ao suplemento SM.

## CONCLUSÕES

Vacas leiteiras Girolando no terço médio de lactação, mantidas em pastagem de capim-Xaraés sob alta oferta de forragem não respondem a suplementação energética ou múltipla.

## REFERÊNCIAS

1. Anuário Estatístico da Pecuária Brasileira - ANUALPEC. São Paulo: Argos Comunicação FNP; 2008.
2. Deresz F. Produção de leite de vacas mestiças Holandês x Zebu em pastagem de capim-elfante, manejada em sistema rotativo com e sem suplementação durante a época das chuvas. Rev Bras Zootec. 2001;30:197-204.
3. Detmann E, Paulino MF, Valadares Filho SC. Otimização do Uso de Recursos Forrageiros Basais. In: Anais do 7º Simpósio de Produção de Gado de Corte; 2010, Viçosa. Viçosa: Editora UFV; 2010. p.191-240.
4. Euclides VPB. Alternativas para a intensificação da carne bovina em pastagem. Campo Grande: EMBRAPA - Gado de Corte; 2000.

5. Cabral LS, Zervoudakis JT, Coppedê CM, Souza AL, Caramori Júnior JG, Polizel Neto A, et al. Suplementação de bovinos de corte mantidos em pastagem de *Panicum maximum* cv. Tanzânia-1 no período das águas. *Rev Bras Saude Prod Anim.* 2008;9:293.
6. Pimentel JJO, Lana RP, Graça DS, Matos LL, Teixeira RMA. Teores de proteína bruta no concentrado e níveis de suplementação para vacas leiteiras em pastagens de capim-braquiária cv. Marandu no período da seca. *Rev Bras Zootec.* 2011;40:418-25.
7. Zervoudakis JT, Paulino MF, Detmann E, Valadares Filho SC, Lana RP, Cecon PR. Desempenho de novilhas mestiças e parâmetros ruminais em novilhos, suplementados durante o período das águas. *Rev Bras Zootec.* 2002;31:1050-8.
8. Minson DJ. Forage in ruminant nutrition. New York: Academic Press; 1990.
9. Paulino MF, Detmann E, Valadares Filho SC. Suplementação Animal em Pasto: Energética ou Protéica? In: Anais do Simpósio de Forragicultura e Pastagem; 2007, Viçosa. Viçosa: Editora UFV; 2007. p.234-67.
10. Costa VAC, Detmann E, Valadares Filho SC, Paulino MF, Henriques LT, Mantovani HC. Degradação in vitro da fibra em detergente neutro de forragem tropical de alta qualidade em função da suplementação com proteína e/ou carboidratos. *Rev Bras Zootec.* 2009;38:1803-11.
11. Moraes EHBK, Paulino MF, Zervoudakis JT, Valadares Filho SC, Moraes KAK. Avaliação qualitativa da pastagem diferida de *Brachiaria decumbens* Stapf., sob pastejo, no período da seca, por intermédio de três métodos de amostragem. *Rev Bras Zootec.* 2005;34:30-5.
12. Silva DJ, Queiroz AC. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 2ª ed. Viçosa: Editora UFV; 2002.
13. Cochran RC, Adams DC, Wallace JD, Galyean ML. Predicting digestibility of different diets with internal markers: Evaluation of four potential markers. *J Anim Sci.* 1986;63:1476-83.
14. Sniffen CJ, O'Connor JD, Van Soest PJ, Fox DG, Russell JBA. Net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J Anim Sci.* 1992;70:3562-77.
15. Hall MB. Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen. Gainesville: University of Florida; 2000. p.A-25. (Bulletin, 339).
16. Sistema de Análises Estatísticas e Genética - SAEG: manual do usuário: versão 5.1. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1995.
17. Paula NF, Zervoudakis JT, Cabral LS, Carvalho DMG, Paulino MF, Hatamoto-Zervoudakis LK, et al. Suplementação infrequente e fontes protéicas para recria de bovinos em pastejo no período seco: parâmetros nutricionais. *Rev Bras Zootec.* 2011; 40:882-91.

18. Euclides VBP, Cardoso EG, Macedo MCM, Oliveira MP. Consumo voluntário de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu sob pastejo. *Rev Bras Zootec.* 2000;29:2200-8.
19. Zervoudakis JT, Paulino MF, Cabral LS, Detmann E, Valadares Filho SC, Moraes EHBK. Parâmetros nutricionais de novilhos sob suplementação em sistema de autocontrole de consumo no período de transição águas-seca. *Rev Bras Zootec.* 2010; 39:2753-62.
20. Zervoudakis JT, Paulino MF, Detmann E, Cabral LS, Valadares Filho SC, Moraes EHBK, et al. Suplementos múltiplos de autocontrole de consumo para recria de novilhos no período das águas: consumo de nutrientes e parâmetros ingestivos. *Rev Bras Saude Prod Anim.* 2008;9:754-61.
21. Porto MO, Paulino MF, Valadares Filho SC, Sales MFL, Leão MI, Couto VRM. Fontes suplementares de proteína para novilhos mestiços em recria em pastagens de capim-braquiária no período das águas: desempenho produtivo e econômico. *Rev Bras Zootec.* 2009;38:1553-60.
22. Semmelmann CEN, Prates ÊR, Gomes IPO, Thaler Neto A, Barcellos JOJ. Suplementação energética ou energético-protéica para vacas leiteiras em pastagem de quicuío (*Pennisetum clandestinum*) no Planalto Sul de Santa Catarina. *Acta Sci Vet.* 2008;36:127-31.

**Recebido em: 10/11/11**

**Aceito em: 13/11/12**

## MICROBIOTA BACTERIANA E FÚNGICA PRESENTES NA CLOACA DE JABUTIS-PIRANGA (*Geochelone carbonaria*) CRIADOS EM DOMICÍLIO

Nilson Roberti Benites<sup>1</sup>  
Carlos Pessoa<sup>2</sup>  
Luciana Bandini<sup>2</sup>  
André Saidenberg<sup>3</sup>  
Andrea Moreno<sup>4</sup>  
Sonia Sakata<sup>5</sup>  
Cleise Gomes<sup>3</sup>  
Priscilla Melville<sup>6</sup>

### RESUMO

A popularidade de jabutis criados como animais de estimação vem crescendo e tem causado preocupação quanto ao seu impacto na saúde pública e animal. Há uma escassez quanto aos estudos envolvendo o isolamento de bactérias e fungos presentes na cloaca de répteis. Este trabalho teve como objetivos o estudo das microbiotas bacteriana (bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas) e fúngica presentes na cloaca de cem jabutis-piranga (*Geochelone carbonaria*) criados em domicílio bem como a pesquisa de genes de virulência em *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. utilizando a PCR. Uma grande diversidade de gêneros de bactérias (18) e fungos (9) foi isolada. Os micro-organismos mais frequentemente isolados foram: *Escherichia coli* (67%), *Klebsiella* spp. (54%), *Bacillus* spp. (42%), *Candida* spp. (42%), *Citrobacter* spp. (33%), *Staphylococcus* spp. (29%), *Aeromonas* spp. (15%) e *Salmonella* spp. (7%). Todos os isolados de *Salmonella* spp. foram positivos para o gene *invA*. Nenhum dos isolados de *E.coli* foi positivo para presença de genes de virulência associados com *E. coli* enterotoxigênica, enteropatogênica e extraintestinal. Deve-se atentar para os cuidados com jabutis criados como *pets*, particularmente quanto aos aspectos de higiene, visando assim a prevenção da transmissão de diferentes micro-organismos, alguns dos quais que albergam genes de virulência.

**Palavras-chave:** *Geochelone carbonaria*, bactérias, fungos, microbiota, genes de virulência

### BACTERIAL AND FUNGAL MICROFLORA PRESENT IN THE CLOACAE OF DOMESTICALLY KEPT RED-FOOTED TORTOISES (*Geochelone carbonaria*)

### ABSTRACT

The popularity of tortoises kept as pets is increasing and has caused concern regarding its impact on public and animal health. There is a lack of studies involving the isolation of bacteria and fungi from cloacae of reptiles. This study aimed to investigate bacterial and fungal agents in the cloacae of a hundred Red-footed tortoises (*Geochelone carbonaria*) domestically kept, as well as to survey for virulence genes in *Escherichia coli* and *Salmonella*

<sup>1</sup> Prof. Associado da FMVZ USP, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

<sup>2</sup> Mestrado no Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, São Paulo - SP

<sup>3</sup> Doutorando no Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, São Paulo - SP

<sup>4</sup> Professora Associada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, São Paulo - SP

<sup>5</sup> Graduanda de Medicina Veterinária da FMVZ-USP

<sup>6</sup> Médica Veterinária – Doutorado em Microbiologia pelo ICB-USP - Laboratório de Bacteriologia e Micologia da FMVZ-USP, São Paulo - SP

spp. using PCR. A great diversity of bacterial genera (18) and fungi (9) were recovered. The microorganisms most frequently isolated were: *Escherichia coli* (67%), *Klebsiella* spp. (54%), *Bacillus* spp. (42%), *Candida* spp. (42%), *Citrobacter* spp. (33%), *Staphylococcus* spp. (29%), *Aeromonas* spp. (15%) and *Salmonella* spp. (7%). All *Salmonella* spp. isolates were positive for the invasion gene *invA*. None of the *E.coli* isolates was positive for virulence genes associated with enterotoxigenic, enteropathogenic and extraintestinal *E. coli*. Proper husbandry measures when owning a tortoise, especially regarding hygiene aspects, are necessary since they aim at the prevention of different microorganisms some, of which harboring virulence genes.

**Keywords:** *Geochelone carbonaria*, bacteria, fungi, microflora, virulence genes

## MICROBIOTA BACTERIANA Y FÚNGICA PRESENTES EN LA CLOACA DE TORTUGAS (*Geochelone carbonaria*) CRIADAS COMO ANIMALES DOMÉSTICOS

### RESUMEN

La popularidad de las tortugas criadas como animales de compañía está creciendo junto con la preocupación por el impacto de estos animales en la salud pública y animal. Existen pocos estudios que incluyen el aislamiento de bacterias y hongos presentes en la cloaca de estos reptiles. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la microbiota bacteriana (aeróbica y anaeróbica facultativa) y fúngica presentes en la cloaca de cien tortugas (*Geochelone carbonaria*) domésticas e investigar genes de virulencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una amplia variedad de géneros de bacterias (18) y hongos (9) fueron aislados siendo *Escherichia coli*. (67%), *Klebsiella* spp. (54%), *Bacillus* spp. (42%), *Candida* spp. (42%), *Citrobacter* spp. (33%), *Staphylococcus* spp. (29%), *Aeromonas* spp. (15%) y *Salmonella* spp. (7%) aislados con mayor frecuencia. Todas las cepas de *Salmonella* spp. fueron positivas para el gen *invA*. Ninguna de las cepas de *E. coli* fue positiva para la presencia de genes de virulencia asociados con *E. coli* enterotoxigénicas, enteropatógenicas y extraintestinales. Se debe prestar atención en el cuidado con tortugas criadas como animales domésticos sobre todo en aspectos de higiene, con objetivo en prevención de la transmisión de diferentes microorganismos, algunos de los cuales son portadores de genes de virulencia.

**Palabras clave:** *Geochelone carbonaria*, bacterias, hongos, microbiota, genes de virulencia

### INTRODUÇÃO

A popularidade de diferentes répteis criados como animais de estimação vem crescendo e tem causado preocupação quanto ao seu impacto na saúde pública, tendo em vista que estes animais podem representar uma fonte potencial de infecção para humanos, na medida em que, por exemplo, eliminam no ambiente micro-organismos oportunistas e patogênicos pelas suas fezes (1, 2).

Veterinários que trabalham com répteis frequentemente são indagados pelos proprietários sobre os tipos de doenças que estes animais podem transmitir, bem como sobre as medidas profiláticas que devem ser tomadas para prevenir a ocorrência e transmissão destas doenças (2). Desta forma, o conhecimento dos micro-organismos que estes animais albergam passa a ser importante para auxiliar na orientação dos proprietários quanto aos cuidados com estes animais e implementação de medidas profiláticas adequadas.

Considerando-se que os répteis participam de forma crescente do mercado de animais criados como *pets* (1, 3), suas características microbiológicas devem ser melhor estudadas e

compreendidas, visando evitar que adoeçam ou venham a óbito devido à ocorrência de doenças infecciosas e não atuem como fontes de infecção para pessoas com as quais convivem. Assim sendo, e considerando a escassa literatura existente acerca do assunto, fica evidente a importância do conhecimento da microbiota dos répteis, para auxiliar na preservação da saúde humana e animal.

O presente trabalho teve como objetivos verificar a ocorrência e frequência das microbiotas bacteriana (bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas) e fúngica presentes na cloaca de jabutis-piranga (*Geochelone carbonaria*) criados em domicílio. Procurou-se também pesquisar genes codificadores de fatores de virulência de linhagens de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. isoladas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de amostras e exame microbiológico

A coleta das amostras foi realizada em domicílios onde são criados jabutis-piranga (*Geochelone carbonaria*) como *pets* na cidade de São Paulo, Brasil. Foram coletados suabes cloacais de 100 animais hígidos os quais foram então acondicionados em meio de Stuart (Oxoid) e encaminhados sob refrigeração ao laboratório. Estes suabes foram inicialmente inoculados em caldo BHI (Oxoid) com incubação a 37°C por 24 horas. As amostras também foram semeadas em ágar sangue de carneiro (5%) e ágar MacConkey, com incubação em aerobiose a 37°C com leituras em 24-48 horas. As amostras cultivadas em caldo BHI foram posteriormente semeadas em ágar sangue e MacConkey e incubadas de forma similar.

Visando a pesquisa de *Salmonella* spp., os suabes também foram inoculados em caldo tetracionato e incubados a 37°C por 24 horas. Paralelamente as amostras foram semeadas em ágar xilose-lisina-tergitol 4 (XLT4) (Difco), com incubação em aerobiose a 37°C com leituras a 24-96 horas. Após a incubação as amostras inoculadas em caldo tetracionato também foram semeadas em ágar XLT4 e incubadas de forma similar.

Para a pesquisa de fungos filamentosos e leveduras, procedeu-se ao cultivo da amostra em caldo Sabouraud-dextrose e ágar Sabouraud-dextrose (Oxoid) com cloranfenicol (100 mg/l) com incubação a 25°C por um período de 3 dias para o caldo e de 7 dias para o ágar que foi submetido a avaliações diárias. As amostras cultivadas em caldo foram posteriormente semeadas em ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol e incubadas de forma similar.

As bactérias isoladas foram identificadas de acordo com características macro e microscópicas bem como por provas bioquímicas conforme descrito por Murray et al. (4). Os fungos filamentosos e leveduras isolados foram identificados de acordo com características macro e microscópicas, bem como por provas fisiológicas, de acordo com Barnett, Payne e Yarrow (5) e Hunter e Hunter (6). Em casos de dúvida, foram utilizados os sistema de identificação RapID® (Oxoid).

### Pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. utilizando a reação em cadeia da polimerase

A pesquisa de fatores de virulência das estirpes de *E.coli* isoladas de suabes cloacais foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a obtenção do material genético foi utilizado o método de extração por choque térmico (7). O sobrenadante foi removido para a realização da PCR. A cada extração realizada foram utilizadas como controles positivos, estirpes de *Escherichia coli* contendo genes codificadores dos fatores de virulência em estudo provenientes da coleção de cepas do Laboratório de Bacteriologia e Micologia da FMVZ-USP.

Foram utilizados os *primers* comercialmente disponíveis para detectar os genes que codificam para pili associados com pielonefrite (*pap*), hemolisina (*hly*), aerobactina (*iuc*), fator necrotizante citotóxico 1 (*cnfI*), fímbria S (*sfa*), adesina afimbrial I (*afa*), intimina (*eae*), enterotoxina termo-lábil (LT), enterotoxina termo-estável (STa e STb) e gene de invasão *invA*. Para a detecção dos fatores de virulência comuns a *E.coli* patogênicas foram utilizados os *primers* e protocolos de reação descritos por Schultz et al. (8) (LT), Olsvik et al. (9) (STa), Blanco et al. (10) (STb), Yamamoto et al. (11) (UPEC), Blanco et al. (12) (*eae*). Para *Salmonella* spp. foi utilizado o *primer* para detecção do gene *invA* de acordo com o protocolo descrito por Rahn et al. (13). Para cada reação foram utilizadas as mesmas estirpes usadas como controles positivos nas reações de extração.

Os produtos de PCR (10µl) foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio (10µg/ml) e fotografados sob luz ultravioleta. O marcador de pares de bases utilizado foi o 100 bp DNA ladder (Invitrogen).

### Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de Fischer, empregando-se o “software” Graphpad Instat 1992-98 (14) para realização dos mesmos.

## RESULTADOS

### Isolamento e identificação de micro-organismos presentes em suabes cloacais de jabutis-piranga.

Foram isoladas bactérias em todas as amostras analisadas ao passo que, fungos foram isolados em 62% delas. A associação entre dois ou mais gêneros e/ou espécies de micro-organismos ocorreu em todas as amostras avaliadas. Foram isoladas bactérias Gram positivas e Gram negativas em, respectivamente, 68 (68%) e 99 (99%) amostras analisadas. Leveduras e fungos filamentosos foram isolados em, respectivamente, 57% e 8% das amostras (Tabela 1).

Foram isolados 18 gêneros de bactérias, 06 gêneros de leveduras e 03 gêneros de fungos filamentosos. Os gêneros de micro-organismos isolados com maior frequência foram os seguintes (Tabela 1): *Escherichia coli* (67%), *Klebsiella* spp. (54%), *Bacillus* spp. (42%), *Candida* spp. (42%), *Citrobacter* spp. (33%), *Staphylococcus* spp. (29%), *Corynebacterium* spp. (15%) e *Aeromonas* spp. (15%), dentre outros. A frequência de isolamentos de *Escherichia coli* foi semelhante à de *Klebsiella* spp. e maior ( $P<0,05$ ) do que as frequências de isolamentos de cada um dos outros gêneros ou espécies de micro-organismos.

Verificou-se que as frequências de isolamentos de bactérias Gram negativas foram maiores ( $P<0,05$ ) do que as de Gram positivas e também maiores ( $P<0,05$ ) que de fungos. Por sua vez, as frequências de isolamentos de bactérias Gram positivas foram semelhantes às de fungos.

### Pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

Nenhuma das 67 estirpes de *E.coli* isoladas foi positiva para presença de genes codificadores dos fatores de virulência *sfa*, *iuc*, *pap*, *cnf*; *hly*, *afa*, *eae*, LT, STa e STb. Por sua vez, todos os 07 isolados de *Salmonella* spp. foram positivos para a presença do gene *invA*.

Tabela 1. Frequências de isolamentos dos micro-organismos isolados a partir dos suabes cloacais de jabutis-piranga (*Geochelone carbonaria*).

Micro-organismos			
Bactérias	%	Bactérias	%
<i>Escherichia coli</i>	67	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	03
<i>Klebsiella</i> spp.	54	<i>Staphylococcus kloosii</i>	03
<i>Bacillus</i> spp.	42	<i>Alcaligenes faecalis</i>	02
<i>Citrobacter</i> spp.	33	<i>Corynebacterium durum</i>	02
<i>Staphylococcus</i> spp.	29	<i>Enterobacter aerogenes</i>	02
<i>Klebsiella oxytoca</i>	27	<i>Enterococcus faecium</i>	02
<i>Citrobacter freundii</i>	20	<i>Proteus mirabilis</i>	02
<i>Aeromonas</i> spp.	15	<i>Proteus vulgaris</i>	02
<i>Corynebacterium</i> spp.	15	<i>Staphylococcus simulans</i>	02
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	<i>Edwardsiella hoshinae</i>	01
<i>Klebsiella ozaenae</i>	12	<i>Enterobacter cloacae</i>	01
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	11	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	01
<i>Corynebacterium striatum</i>	10	<i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	01
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	09	<i>Staphylococcus lentus</i>	01
<i>Micrococcus</i> spp.	09		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	08		
<i>Acinetobacter</i> spp.	08	<b>Leveduras</b>	
<i>Enterococcus</i> spp.	07	<i>Candida</i> spp.	42
<i>Salmonella</i> spp.	07	<i>Candida tropicalis</i>	22
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	07	<i>Candida krusei</i>	10
<i>Streptococcus</i> sp.	07	<i>Rhodotorula</i> spp.	09
<i>Aeromonas caviae</i>	06	<i>Trichosporon</i> spp.	09
<i>Aeromonas sobria</i>	06	<i>Candida lusitaniae</i>	07
<i>Serratia marcescens</i>	06	<i>Candida guilliermondi</i>	03
<i>Edwardsiella</i> spp.	05	<i>Torulopsis</i> spp.	02
<i>Enterococcus faecalis</i>	05	<i>Aureobasidium</i> sp.	01
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	04	<i>Geotrichum candidum</i>	01
<i>Acinetobacter Iwofii</i>	04		
<i>Citrobacter koseri</i>	04	<b>Fungos filamentosos</b>	
<i>Edwardsiella tarda</i>	04	<i>Rhizopus</i> spp.	04
<i>Proteus</i> spp.	04	<i>Mucor</i> spp.	03
<i>Aeromonas hydrophila</i>	03	<i>Penicillium</i> sp.	01
<i>Corynebacterium xerosis</i>	03		
<i>Enterobacter</i> spp.	03		

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A quantidade de répteis criados como *pets* em domicílios apresentou um aumento significativo nos últimos anos sendo que o risco de desenvolver infecções causadas por micro-organismos transmitidos por estes animais também aumentou em igual proporção (15). Segundo diferentes autores, répteis criados em domicílios podem apresentar risco potencial de transmissão de diferentes micro-organismos (2, 16).

Há uma escassez de estudos envolvendo o isolamento de bactérias e fungos de cloaca de répteis, particularmente de jabutis-piranga. No presente estudo, uma grande diversidade de gêneros de bactérias (n=18) e fungos (n=9) foi isolada, todos também comumente encontrados no trato intestinal de humanos e outros animais. Todas as espécies bacterianas isoladas já foram descritas como agentes de infecções em répteis havendo poucos relatos em jabutis (15, 16). Existem também relatos de isolamentos de alguns destes micro-organismos a partir de microbiota de diferentes répteis, sendo escassas as informações em jabutis (17-19).

Répteis criados como *pets* são menos suscetíveis às doenças infecciosas quando o proprietário adota medidas adequadas quanto ao manejo dos animais. Entretanto, os micro-

organismos que compõem a microbiota podem se tornar patogênicos para seus hospedeiros quando os mesmos encontram-se debilitados (20). No presente estudo, *Pseudomonas* spp. (8%) e *Aeromonas* spp. (15%) foram os principais patógenos bacterianos isolados que apresentam potencial risco para jabutis (2). *Klebsiella* spp. (54%), *Citrobacter* spp. (33%), *Staphylococcus* spp. (29%), *Corynebacterium* spp. (15%), *Streptococcus* spp. (7%), *Edwardsiella* spp. (5%), *Proteus* spp. (4%), *Enterobacter* spp. (3%) podem, sob determinadas circunstâncias, ser patogênicos para estes animais (2). Todos os micro-organismos isolados também apresentam importância para a saúde humana, podendo estar associados a diferentes síndromes clínicas (4), ressaltando-se assim a importância da implementação de medidas preventivas relacionadas ao contato com estes animais.

O micro-organismo mais frequentemente isolado foi *Escherichia coli* (67% das amostras). Quando consideradas outras espécies de répteis, pode-se mencionar o estudo de Meyer-Junior, Dias e Araujo (18) que isolaram *Escherichia coli* (66%) a partir de 15 suabes de cloaca de tartarugas gigantes sul-americanas (*Podocnemis expansa*); também isolaram *E. coli* (26%) a partir de 15 suabes de cloaca de muçuãs (*Kinosternon scorpioides*) mantidas em cativeiro. No presente estudo, embora tenha sido elevada a ocorrência de *E. coli*, deve-se ressaltar que nenhuma das estirpes apresentou genes codificadores dos fatores de virulência pesquisados (*pap*, *iuc*, *cnf1*, *sfa*, *afa*, *hly*, *eae*, LT, STa e STb) os quais estão comumente associados a doenças em humanos. Estes resultados apresentam importância sob o ponto de vista de saúde pública, tendo em vista que, particularmente no que se refere a este micro-organismo, pode-se concluir que são baixos os riscos relacionados ao convívio entre humanos e estes *pets* que albergam *E. coli*. Na literatura pesquisada não foram encontradas referências acerca de estudos de fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de jabutis ou répteis em geral.

Um total de 7% de *Salmonella* spp. foram isoladas no presente estudo. Saelinger et al. (21) examinaram suabes de cloaca de 94 tartarugas não tendo isolado *Salmonella* spp. de nenhuma das amostras. Strohl et al. (22), por sua vez, avaliaram fezes de 52 quelônios, dentre os quais 03 *Geochelone carbonaria*, tendo verificado presença de *Salmonella* spp. em 23% das amostras, sendo que nas amostras oriundas de *Geochelone carbonaria* este micro-organismo não foi isolado. Existe uma grande variabilidade de resultados quando se trata do isolamento de *Salmonella* spp. a partir de diferentes espécies de répteis (21, 23, 24). *Salmonella* spp. geralmente não causam infecções em répteis (20), mas constituem causa importante de doenças no ser humano (25). No presente estudo, todos os isolados de *Salmonella* apresentavam o gene *invA*, essencial para expressão da virulência (26). Trata-se de um achado relevante no tocante à saúde animal e humana considerando-se as propriedades de virulência e importância clínica do gene *invA*.

Relatos de fungos isolados da cloaca de répteis mantidos como *pets* são escassos. As informações disponíveis são limitadas a leveduras em animais doentes ou necropsiados ou àquilo que possa ser extrapolado de animais selvagens (15). No presente estudo, fungos (leveduriformes e/ou filamentosos) foram isolados a partir de 62% das amostras, sendo que em nove (9%) delas havia mais de um gênero e/ou espécie de fungo. A ocorrência do mesmo gênero e/ou espécie de fungo em hospedeiros diferentes, como foi o caso de *Candida tropicalis* isolada a partir de 22 jabutis, assim como a presença de diferentes fungos em um mesmo hospedeiro, sugere que os répteis possam atuar como animais carreadores de fungos filamentosos e leveduras em suas cloacas.

Medidas simples são consideradas orientações básicas para a manutenção de répteis como *pets*. Os proprietários destes animais devem atentar para as boas práticas de criação e manejo para assim evitar ou reduzir o estresse que representa a principal condição predisponente para a ocorrência de doenças. A maior parte das infecções em répteis é causada por patógenos oportunistas que infectam animais imunossuprimidos. Por sua vez, os jabutis criados como *pets* podem se transformar em fontes de infecção para humanos e vice-versa. O

risco de transmissão de micro-organismos entre animais ou entre o animal e o homem pode ser minimizado quando implementadas as precauções necessárias relativas a aspectos de higiene. Deve-se considerar ainda que, a ausência da aplicação de medidas de manejo adequadas pode estar relacionada à oportunidade de transmissão de micro-organismos que apresentam genes codificadores de fatores de virulência.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à colaboração de Clarice Yukari Minagawa e Marina Caravatto Baras pelos seus valiosos auxílios na realização dos exames laboratoriais. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 07/55784-5) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Bolsa de Mestrado de Carlos Alexandre Pessoa).

## REFERÊNCIAS

1. Ebani V, Fratini F, Ampola M, Rizzo E, Cerri D, Andreani E. Pseudomonas and Aeromonas isolates from domestic reptiles and study of their antimicrobial in vitro sensitivity. *Vet Res Commun.* 2008;32(Suppl 1):195-8.
2. Johnson-Delaney CA. Reptile zoonoses and threats to public health. In: Mader DR, editor. *Reptile medicine and surgery.* 2a ed. Londres: W.B. Saunders; 2006. p.1017-30.
3. Pessoa CA. Avaliação da microbiota bacteriana e fúngica em fezes de jabutis (*Geochelone carbonaria*) criados em domicílio e análise do potencial risco à saúde humana [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2009.
4. Murray PR, Baron EJ, Pfaller M, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of clinical microbiology.* 8a ed. Washington: American Society for Microbiology; 2003.
5. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. *Yeasts: characteristics and identification.* Cambridge: University Press; 2000.
6. Hunter B, Hunter BB. *Illustrated genera of imperfect fungi.* Minneapolis: Burgess Publishing; 1998.
7. Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol.* 2007;123:145-52.
8. Schultsz C, Pool GJ, Van Ketel R, Wever D, Speelman P, Dankert J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using non-radioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2393-7.
9. Olsvik OJ, Wahlberg B, Petterson M, Uhlen T, Popovic IK, Wachsmuth K, et al. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:22-5.
10. Blanco M, Blanco JE, Gonzalez EA, Mora A, Janse W, Gomes TAT, et al. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different

- O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:2958-63.
11. Yamamoto S, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1995;2:85-90.
  12. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae- ). *J Clin Microbiol.* 2004;42:645-51.
  13. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss III R, et al. Amplification of an *invA* sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes.* 1992;6:271-9.
  14. Graphpad InStat Software. Statistical analysis for personal computers. San Diego; 1992-1998.
  15. Nardoni S, Papini R, Marcucci G, Mancianti F. Survey on the fungal flora of the cloaca of healthy pet reptiles. *Rev Med Vet.* 2008;159:159-65.
  16. Frye FL. Reptile care: an atlas of diseases and treatments. v.I. USA: TFH Publications; 1991.
  17. Dickinson V, Duck T, Schwalbe C, Jarchow J, Trueblood M. Nasal and cloacal bacteria in free-ranging desert tortoises from the western United States. *J Wildl Dis.* 2001;37:252-7.
  18. Meyer-Junior JC, Dias H, Araujo J. Determinação qualitativa das enterobactérias presentes no trato digestivo da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) mantidas em cativeiro. In: Anais do 7º Congresso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre na Amazônia e América Latina; 2006, Ilhéus. Ilhéus-BA: UESC; 2006.
  19. Santoro M, Gómez G, Caballero M. Aerobic bacterial flora of nesting green turtles (*Chelonia mydas*) from Tortuguero National Park, Costa Rica. *J Zoo Wildl Med.* 2006; 37:549-52.
  20. Mader D. Reptile medicine and surgery. Missouri: Saunders Elsevier; 2006.
  21. Saelinger C, Lewbart G, Christian L, Lemons C. Prevalence of *Salmonella* spp. in cloacal, fecal, and gastrointestinal mucosal samples from wild North American turtle. *J Am Vet Med Assoc.* 2006;229:266-8.
  22. Strohl P, Tilly B, Freymy S, Brisabois A, Guerin-Faubleee V. Prevalence of *Salmonella* shedding in faeces by captive chelonians. *Vet Rec.* 2004;154:56-8.
  23. Kabeya H, Fujita M, Morita Y, Yokoyama E, Yoda K, Yamauchi A, et al. Prevalence of *Salmonella*, *Pasteurella* and *Staphylococcus* among pet green iguanas in Japan. *J Jpn Vet Med Assoc.* 2008;61:70-4.

24. Richards JM, Brown JD, Kelly TR, Fountain AL, Sleeman JM. Absence of detectable Salmonella cloacal shedding in free-living reptiles on admission to the Wildlife Center of Virginia. J Zoo Wildl Med. 2004;35:562-3.
25. Mead P, Slutsker J, Dietz V, Mccaig L, Bresee J, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis. 1999;5:607-25.
26. Galan JE, Curtiss III R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *S. typhimurium* to penetrate tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86:6383-7.

**Recebido em: 27/02/12**

**Aceito em: 14/11/12**

## ROIIVACAÍNA ISOLADA OU ASSOCIADA À MORFINA, BUTORFANOL OU TRAMADOL PELA VIA PERIDURAL EM CADELAS PARA REALIZAÇÃO DE OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA.

Verônica Batista de Albuquerque<sup>1</sup>  
Talita Floering Brêda Souza<sup>2</sup>  
Maria Carolina Ribeiro Vivan<sup>2</sup>  
Joana Zafalon Ferreira<sup>3</sup>  
Marcelo Carnelli Frade<sup>4</sup>  
Silvia Helena Venturolli Perri<sup>5</sup>  
Valéria Nobre Leal de Souza Oliva<sup>6</sup>

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo investigar a utilização da ropivacaína isolada ou em associação a diferentes opióides, na anestesia peridural de cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva. Participaram do estudo, 32 cadelas sadias, adultas, de diferentes raças, com peso médio de 10,5kg, as quais foram pré-medicadas com acepromazina (0,05mg/kg, IM) associada ao midazolam (0,2mg/kg, IM), distribuídas em quatro grupos distintos: Grupo 1(n=8): ropivacaína: 0,3 mL/kg; Grupo 2(n=8): ropivacaína + morfina (0,1 mg/kg); Grupo 3(n=8): ropivacaína + butorfanol (0,1 mg/kg); e Grupo 4(n=8): ropivacaína + tramadol (0,5 mg/kg) administrados pela via peridural. Foram mensurados: frequência cardíaca; frequência respiratória; pressão arterial sistólica; temperatura retal; pressão parcial dos gases sanguíneos (arterial); pH sanguíneo; além da avaliação não-paramétrica do grau de sedação, grau de sangramento e de relaxamento muscular seguindo tabelas de escores. Os dados foram submetidos à ANOVA e comparados pelos testes de Kruskal Wallis, Friedman, Dunn, Tukey e Qui-quadrado ( $p \leq 0,05$ ). Foram observadas alterações cardiorrespiratórias que não comprometeram os parâmetros fisiológicos dos animais, sendo que o grupo da ropivacaína associada ao butorfanol apresentou um bloqueio mais cranial, o que permitiu a realização de OSH sem necessidade de indução em 75% dos animais, sendo que 25% necessitaram de resgate anestésico. Concluiu-se que a utilização da ropivacaína isolada ou associada à morfina, ao butorfanol ou ao tramadol pela via peridural não ocasionou depressão cardiorrespiratória significativa, sendo que a ropivacaína associada ao butorfanol permitiu a realização de OSH em cadelas.

**Palavras-chave:** cadelas, opióides, ovariosalpingohisterectomia, eridural, opivacaína.

## ROIIVACAINE SOLE OR ASSOCIATED WITH MORPHINE, BUTORPHANOL OR TRAMADOL BY EPIDURAL INJECTED IN THE BITCHES FOR OVARIOSALPINGOHISTERCTOMY ACCOMPLISHMENT.

### ABSTRACT

<sup>1</sup> Aluna regular do Programa de Pós-graduação em Anestesiologia - Curso de Doutorado - Faculdade de Medicina Unesp Botucatu - Rua Raposo de Melo - 801, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP - Brasil. CEP 16050-670, (18) 36092533, e-mail - [vevebat@yahoo.com.br](mailto:vevebat@yahoo.com.br) - Autor para correspondência.

<sup>2</sup> Aluna Regular do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - Curso de Mestrado - Unesp - Araçatuba, SP - Brasil.

<sup>3</sup> Programa de Residência Médico Veterinária - Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - Unesp - Araçatuba, SP - Brasil.

<sup>4</sup> Médico Veterinário Autônomo - Araçatuba, SP - Brasil.

<sup>5</sup> Professora Assistente Doutora da Unesp - Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal - Curso de Medicina Veterinária - Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Araçatuba, SP, Brasil.

<sup>6</sup> Professora Adjunto - Departamento de Clínica Cirurgia e Reprodução Animal - Curso de Medicina Veterinária - Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Araçatuba, SP, Brasil.

The aim of this study was to investigate the use of ropivacaine combined or not with different opioids, for epidural anesthesia in bitches submitted to elective ovariosalpingohysterectomy (OSH). Thirty two mixed-breed female dogs, adults were used with medium weigh of 10.5kg. The animals were premedicated with acepromazine ( $0.05\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , IM) and midazolam ( $0.2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , IM) and allocated in four experimental groups: group 1(n=8): ropivacaine:  $0.3\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; group 2(n=8): ropivacaine + morphine ( $0.1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); group 3(n=8): ropivacaine + butorphanol ( $0.1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); and group 4(n=8): ropivacaine + tramadol ( $0.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) administered epidurally. Heart and respiratory rate; systolic arterial pressure; rectal temperature; arterial blood gas partial pressures; blood pH; sedation and muscular relaxation degree were evaluated at different experimental moments. The data were submitted to ANOVA and compared by Kruskal Wallis, Friedman, Dunn, Tukey and Chi-square test ( $p\leq 0.05$ ). Minimum cardiorespiratory alterations were observed and the group of the ropivacaine combined with the butorphanol (G3) presented a more cranial blockage, what allowed the accomplishment of OSH without induction in six animals (75%) whereas most of the others needed anesthetic rescue. The results allow us to conclude that the use of ropivacaine sole or combined with morphine, butorphanol or tramadol, for epidural anesthesia, didn't promote significant cardiorrespiratory depression and the ropivacaine associated to the butorphanol allowed the accomplishment of OSH in bitches.

**Keywords:** bitches, opioids, ovariosalpingohysterectomy, epidural, ropivacaine.

## **ROPIVACAINA AISLADA O ASOCIADA A LA MORFINA, BUTORFANOL O TRAMADOL POR VÍA PERIDURAL EN PERRAS PARA REALIZACIÓN DE OVARIOSALPINGOHISTERECTOMÍA.**

### **RESUMEN**

El presente trabajo tuvo como objetivo investigar la utilización de la ropivacaina aislada o asociada a diferentes opioides para la anestesia peridural en perras sometidas a ovariosalpingohisterectomía (OSH) electiva. Participaron del estudio doble ciego, 32 perras sanas, adultas, de diferentes razas, de entre seis y 15 kg que fueron premedicadas con acepromacina ( $0,05\text{mg}/\text{kg}$ , IM) asociada a midazolam ( $0,2\text{mg}/\text{kg}$ , IM). Los animales fueron distribuidos en cuatro grupos: Grupo 1: ropivacaina:  $0,3\text{ mL}/\text{kg}$ ; Grupo 2: ropivacaina + morfina ( $0,1\text{ mg}/\text{kg}$ ); Grupo 3: ropivacaina + butorfanol ( $0,1\text{ mg}/\text{kg}$ ); y Grupo 4: ropivacaina + tramadol ( $0,5\text{ mg}/\text{kg}$ ) administrados por vía peridural. Fueron medidas: frecuencia cardiaca; frecuencia respiratoria; tensión arterial sistólica; temperatura rectal; tensión parcial de gases sanguíneos (arterial); pH sanguíneo; además de la evaluación no-paramétrica del grado de sedación, grado de sangrado y de relajamiento muscular siguiendo tablas de puntuaciones. Los datos fueron sometidos a ANOVA y comparados por medio de las pruebas de Kruskal-Wallis, Friedman, Dunn, Tukey y Chi-cuadrado ( $p\leq 0,05$ ). Se concluyó que la utilización de la ropivacaina aislada o asociada a la morfina, al butorfanol o al tramadol por vía peridural no promovió depresión cardiorrespiratoria significativa y la ropivacaina asociada al butorfanol permitió la realización de OSH en perras.

**Palabras clave:** perras, opioides, ovariosalpingohisterectomía, peridural, ropivacaina.

## INTRODUÇÃO

Alguns aspectos positivos podem ser considerados com o uso da anestesia peridural lombo-sacra para realização de ovariosalpingohisterectomia em cadelas, destacando-se mínimas alterações cardiorrespiratórias, controle da dor pós-operatória, além da redução do estresse trans-operatório (1). Uma opção mais recente para uso por essa via é a ropivacaína, que é um análogo da bupivacaína de potência anestésica semelhante, sendo, porém, menos cardiotoxica e promovendo maior diferenciação entre os efeitos sensoriais e motores (2).

Nas técnicas de anestesia balanceada utilizam-se, com frequência, os fármacos opióides associados aos anestésicos locais, seja no período pré ou trans-operatório e pelas diversas vias de aplicação, tendo como objetivo principal a analgesia, bem como a redução do consumo do anestésico e a promoção de mais conforto aos pacientes (3). Ishy et al. (4) observaram a extensão cranial do bloqueio anestésico chegando até T<sub>12</sub> ao associarem lidocaína e butorfanol pela via peridural, o que permitiu a realização de cirurgia de OSH em cadelas.

A morfina é um agonista  $\mu$  ( $\mu$ ) puro com ação moderada sobre receptores delta ( $\delta$ ) e kappa ( $\kappa$ ). A dose recomendada é de 0,1mg/kg pela via peridural em cães (5, 6). É amplamente utilizada na Medicina Veterinária em virtude de sua eficiência no tratamento das dores que se manifestam após cirurgias de moderado e grande porte (7). Quando administrada de forma preemptiva, contribui para minimizar a hiperglicemia e a liberação de cortisol e de catecolaminas em resposta à dor decorrente da OSH em cadelas (8).

O butorfanol é um agonista sintético dos receptores  $\kappa$  e um fraco antagonista dos receptores  $\mu$ . Um estudo desenvolvido por Troncy et al. (9) constatou que o uso do butorfanol (0,25mg/kg) por esta via em cães anestesiados com isoflurano, permitiu a redução da concentração alveolar mínima do agente inalante em 31%, além de promover prolongamento do tempo de analgesia cutânea por aproximadamente três horas após final da anestesia com o isoflurano.

O tramadol é um agente opióide atípico, cujo efeito analgésico deve-se à sua ação sobre os receptores opióides, principalmente do tipo  $\mu$ , e a um mecanismo não-opióide, provavelmente relacionado com a inibição neuronal da recaptção de noradrenalina ou serotonina (10, 11). É praticamente desprovido de efeito deletério da função cardíaca ou de depressão respiratória. No entanto, tal efeito pode ser observado com a utilização de doses elevadas (12). Campagnol et al. (13), ao associarem lidocaína ao tramadol pela via peridural em cadelas verificaram que tal associação não permitiu a realização da OSH.

Sendo assim o presente trabalho objetivou investigar o uso da ropivacaína isolada ou em associação a diferentes opióides, na anestesia peridural de cadelas a serem submetidas à OSH, comparando-se o período de latência, de bloqueio sensitivo e motor, assim como avaliar os efeitos cardiorrespiratórios das diferentes associações.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no laboratório de cirurgia e anestesiologia experimental de uma instituição pública de ensino, utilizando-se 32 cadelas, adultas, de diferentes raças, com peso médio de 10,5kg, pré-selecionadas para a realização da OSH eletiva. Os animais pré-selecionados foram submetidos a exame físico completo, colheita de sangue para realização de hemograma completo e para a sorologia para a Leishmaniose (por tratar-se de uma região endêmica para doença) e, somente aqueles que não apresentaram alterações nestes exames foram incluídos no estudo.

Para a realização do estudo, as cadelas foram mantidas em jejum alimentar de 12 horas e hídrico de quatro horas e, em seguida, receberam como medicação pré-anestésica a

associação de acepromazina (0,05mg/kg)<sup>7</sup> + midazolam (0,2mg/kg)<sup>8</sup> pela via intramuscular, além de um botão anestésico com 0,5 mL de ropivacaína no local da injeção peridural com o propósito de dessensibilizar a região. Decorridos 15 minutos, foi executada a punção peridural na região lombo-sacra (L<sub>7</sub> – S<sub>1</sub>) após tricotomia e anti-sepsia da região. Foi introduzido um cateter 24 (para animais pesando de 6 a 10 kg) ou 22<sup>9</sup> (para animais com peso de 10 a 15 kg) no espaço intervertebral lombo-sacro até ultrapassar o ligamento amarelo e atingir o espaço peridural. Confirmava-se a localização correta da agulha pela observação da aspiração de uma gota de solução de NaCl a 0,9% colocada previamente no canhão da agulha. A anestesia foi realizada sempre pelo mesmo anestesista a fim de não haver interferência nos resultados.

Os animais foram alocados em quatro grupos experimentais, determinando-se a ordem de participação por sorteio e de maneira duplamente encoberta, sendo: grupo 1 (n=8) - ropivacaína<sup>10</sup> isolada (0,3mL/kg), grupo 2 (n=8) - ropivacaína + morfina<sup>11</sup> (0,1mg/kg), grupo 3 (n=8) - ropivacaína + butorfanol<sup>12</sup> (0,1mg/kg) e grupo 4 (n=8) - ropivacaína + tramadol<sup>13</sup> (0,5mg/kg). Nos grupos 2, 3 e 4 a ropivacaína foi acrescentada ao opióide em volume tal que resultasse em um volume final de 0,30 mL/kg em todos os grupos. Após a aplicação da anestesia peridural (realizada dentro de um período padronizado de um minuto), os animais foram mantidos em decúbito esternal por 30 minutos (14, 15), a fim de que houvesse distribuição bilateral dos fármacos (6).

Na seqüência, iniciou-se a cirurgia de OSH por laparotomia com ligadura primeiramente do pedículo esquerdo e seqüencialmente do direito com fio de nylon<sup>14</sup> nº 2-0 e por último do coto uterino com fio de nylon 3-0. Ato contínuo foi realizada a laparorrafia com fio de nylon nº 3-0. As cirurgias foram realizadas sempre pela mesma equipe cirúrgica e obedecendo a mesma técnica e com os animais em decúbito dorsal e tiveram duração média de 26,6 ± 2,9 minutos. Caso houvesse manifestação de dor durante a cirurgia (elevação significativa de FC e PAS) ou movimentação do animal frente ao estímulo doloroso, era realizada a indução anestésica com tiopental sódico<sup>15</sup> (6,5mg/kg) associado ao midazolam (0,2mg/kg) para a manutenção do animal em plano anestésico cirúrgico. Neste estudo foi considerado como elevação significativa, valores de FC e PAS acima de 10% em relação à mensuração imediatamente anterior.

Foram considerados os seguintes momentos experimentais: Momento zero (M<sub>0</sub>) – animal sem anestesia; Momento 1 (M<sub>1</sub>) – 15 minutos após MPA; Momento 2 (M<sub>2</sub>) – subseqüentemente à injeção peridural do(s) fármaco(s); Momento 3 (M<sub>3</sub>) – 30 minutos após peridural, Momento 4 (M<sub>4</sub>) – momento da ligadura do pedículo esquerdo, Momento 5 (M<sub>5</sub>) – momento de ligadura do pedículo direito, Momento 6 (M<sub>6</sub>) – momento de ligadura do cérvix uterino, Momento 7 (M<sub>7</sub>) – início de sutura da cavidade e Momento 8 (M<sub>8</sub>) – final da sutura de pele. Em cada momento foram avaliados a frequência cardíaca (FC) por meio da auscultação cardíaca com auxílio de estetoscópio<sup>16</sup>; a frequência respiratória (f) por meio de auscultação pulmonar também com o uso de estetoscópio ou pela observação da movimentação torácica pelos movimentos respiratórios; a temperatura retal (TR) mensurada com termômetro clínico digital<sup>17</sup>; a pressão arterial sistólica não-invasiva por “Doppler”

<sup>7</sup> Acepran 1% - Univet S/A Ind. Veterinária – São Paulo - SP.

<sup>2</sup> Dormire – Cristália prod. Químicos e farmacêuticos Ltda.

<sup>9</sup> Cateter BD Insyte 24/22G - Becton, Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda. - Juiz de Fora - MG.

<sup>10</sup> Naropin 0,75% - Astra-Zeneca do Brasil Ltda.

<sup>11</sup> Dimorf – Cristália Prod. Químicos e Farmacêuticos Ltda.

<sup>12</sup> Torbugesic – Fort Dodge Animal Health.

<sup>13</sup> Cloridrato de tramadol – Ratiopharm Mepha.

<sup>14</sup> Fio de sutura Brasuture suturas cirúrgicas Ltda, São Sebastião da Gama – SP.

<sup>15</sup> Thiopentax 1,0g - Cristália Prod. Químicos e Farmacêuticos Ltda.

<sup>16</sup> Littman – Lightweight II - USA

<sup>17</sup> Termômetro clínico – RC5 BD – São Paulo – SP

ultrassônico<sup>18</sup>; a mensuração de gases sanguíneos<sup>19</sup> (hemogasometria arterial), por meio de amostras de sangue arterial colhidas a partir de punção direta da artéria femoral com seringa de gasometria<sup>20</sup> e agulha de insulina (0,45 x 13 mm).

Foi observado o período de latência desde a aplicação dos fármacos pela via peridural até o relaxamento do esfíncter anal observado pela ausência de resposta ao toque de uma agulha hipodérmica na região; desaparecimento da dor superficial avaliado pelo pinçamento interdigital com pinça cocker revestida por um tubo de látex e fechada até o segundo dente da cremalheira em ambos os membros; ausência do tônus de cauda; ausência de tônus postural.

Observou-se ainda, o período de duração do bloqueio, considerando o tempo decorrido desde a completa ausência de dor superficial até a recuperação completa do animal (reposicionamento quadrupedal, sem ataxia).

Foi avaliado o grau de sedação utilizando-se tabela de escores segundo Pibarot et al. (16). Realizou-se ainda, a avaliação do grau de sangramento e de relaxamento muscular apresentado durante os momentos de ligadura dos pedículos e do coto uterino, analisado pelos cirurgiões, por meio de uma tabela de escores, sendo: 0: ruim - sem relaxamento muscular/dificuldade para tracionar o pedículo/com bastante sangramento; 1: regular – pouco relaxamento muscular/menos resistência para tracionar o pedículo/sangramento moderado; 2: bom – bom relaxamento muscular/sem dificuldade para tracionar o pedículo, porém não totalmente relaxado/pouco sangramento; 3: ótimo – excelente relaxamento muscular/pedículo totalmente relaxado/pouquíssimo sangramento.

Os dados obtidos foram tabulados pelo programa SAS (17) e analisados considerando-se nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Realizou-se análise de variância com medidas repetidas para as variáveis que apresentaram distribuição normal. Para aquelas em que a distribuição não foi normal usou-se o teste não paramétrico (para variáveis qualitativas ordinais) de Kruskal Wallis. Este teste foi utilizado para comparar grupos em cada momento, enquanto o teste de Friedman para comparar momentos em cada grupo. O teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) verificou associações entre variáveis qualitativas e suas respostas nominais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mesmo sob o efeito da MPA e tendo sido realizado um botão anestésico com 0,5 mL de ropivacaína no local da injeção peridural, com o propósito de dessensibilizar a região, a grande maioria dos animais demonstrou desconforto no momento da aplicação, sendo necessárias no mínimo três pessoas para contê-los. Tal fato deve ser levado em consideração para a aplicação clínica da técnica que será mais segura quando houver a disponibilidade de várias pessoas no momento da aplicação peridural. Na falta desta possibilidade, recomenda-se que o procedimento seja realizado sob anestesia geral.

Após a aplicação da MPA não foram observadas alterações significativas da FC, sendo esta mantida dentro dos valores considerados normais para a espécie. No grupo da ropivacaína associada ao butorfanol, entretanto, foi evidenciada diminuição da FC 30 minutos após a realização da anestesia peridural o que diferiu dos relatos de Ischy et al. (4); Maia (18), que não observaram alterações importantes dessa variável ao utilizarem lidocaína e ropivacaína, respectivamente, associadas ao butorfanol pela via peridural. Tal fato pode estar relacionado à sedação adicional obtida nos animais deste grupo, devido, certamente, ao efeito do butorfanol, que apresenta uma latência de 10-20 minutos por essa via e, certamente, já estaria agindo. Já no grupo no qual o tramadol foi associado à ropivacaína, houve diminuição da FC no início do procedimento anestésico ( $M_2$ ) que perdurou até o momento seguinte ( $M_3$ ).

<sup>18</sup> Doppler veterinário DV10 – Microehm Produtos Médicos – Ribeirão Preto - SP

<sup>19</sup> Aparelho de gasometria Roche OMNI-C Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos SA. São Paulo - SP.

<sup>20</sup> Seringa de hemogasometria sem agulha – BD A-Line - Juiz de fora – MG.

Esse efeito pode ser atribuído à MPA aplicada. A partir do início da cirurgia (M<sub>4</sub>) até o momento final (M<sub>8</sub>) os valores da FC aumentaram, provavelmente devido aos efeitos do tiopental utilizado para indução à anestesia geral em 75% dos animais deste grupo. Tal fato discorda das citações de Campagnol et al. (13) que não evidenciaram alterações dos parâmetros cardiorespiratórios ao utilizarem tramadol associado à lidocaína pela via peridural em cães (tabela 1).

Tabela 1. Média ( $\bar{x}$ ) e erro padrão da média (EPM) da frequência cardíaca (FC), em batimentos por minuto (bpm), de cadelas submetidas à anestesia peridural com ropivacaína isolada (G1), ropivacaína associada à morfina (G2), ropivacaína associada ao butorfanol (G3) e ropivacaína associada ao tramadol (G4).

Momento	FC ( $\bar{x} \pm$ EPM)			
	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	G <sub>4</sub>
M0	108 ± 11 aA	129 ± 13 aA	120 ± 5 aAB	130 ± 12 aABC
M1	132 ± 11 aA	123 ± 8 aA	122 ± 7 aA	124 ± 12 aABC
M2	115 ± 20 aA	108 ± 12 aA	85 ± 8 aC	95 ± 8 aC
M3	111 ± 12 aA	99 ± 9 aA	97 ± 5 aABC	111 ± 12 aBC
M4	126 ± 11 aA	128 ± 17 aA	110 ± 7 aABC	151 ± 10 aA
M5	131 ± 7 aA	129 ± 17 aA	110 ± 13 aABC	141 ± 10 aAB
M6	121 ± 7 aA	120 ± 12 aA	81 ± 6 bC	141 ± 11 aAB
M7	138 ± 10 aA	124 ± 13 abA	88 ± 11 bC	144 ± 13 aAB
M8	133 ± 12 abA	137 ± 16 abA	89 ± 7 bBC	146 ± 13 aAB

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

No momento basal observou-se que os valores da  $f$  apresentavam-se elevados nos quatro grupos estudados, sendo que alguns animais chegavam inclusive a apresentar-se taquipneicos. Pode-se atribuir tal fato, ao estresse sofrido pelos pacientes, que muitas vezes chegavam ao laboratório bastante agitados. Foi observada redução (mesmo que não estatisticamente significativa) dos seus valores a partir do momento (M<sub>1</sub>) em todos os grupos estudados, resultante, provavelmente, dos efeitos da MPA uma vez que os fenotiazínicos são capazes de alterar a frequência respiratória por produzirem efeito calmante (19). Apesar da redução da  $f$  os valores mantiveram-se dentro dos parâmetros considerados normais para a espécie, sem causar alterações clínicas consideráveis. Segundo Valverde et al. (20); Day et al. (21) os efeitos respiratórios da injeção peridural de morfina a 0,1mg/kg, isoladamente ou em associação com anestésicos locais parecem não ter relevância clínica (tabela 2).

Observou-se uma redução da TR mesmo se mantendo a temperatura ambiente em torno de 25°C, fazendo-se uso de colchão térmico<sup>21</sup> e da média de tempo do procedimento cirúrgico ter sido relativamente rápida (26,6 ± 2,9 minutos). Tal diminuição ocorreu de maneira gradual, comparando-se aos valores basais, a partir dos 30 minutos da peridural (M<sub>2</sub>) em todos os grupos, tal fato possivelmente decorreu dos efeitos da acepromazina que comprovadamente causa redução da temperatura corporal por depressão do sistema termorregulador do hipotálamo e vasodilatação periférica (19, 22). Já a anestesia peridural pode influenciar na redução da temperatura corporal pela absorção sistêmica do anestésico e

<sup>21</sup> Sistema de Normoterapia Gaymar – Processo Fapesp 2005/02134-8

transferência central do anestésico via fluido cerebrospinal, causando depressão do centro termorregulador ou promovendo bloqueio simpático (23, 24), o que também pode ter contribuído para os resultados obtidos neste estudo (tabela 3).

Tabela 2. Média ( $\bar{x}$ ) e erro padrão da média (EPM) frequência respiratória ( $f$ ), em movimentos por minuto (mpm), de cadelas submetidas à anestesia peridural com ropivacaína isolada ( $G_1$ ), ropivacaína associada à morfina ( $G_2$ ), ropivacaína associada ao butorfanol ( $G_3$ ) e ropivacaína associada ao tramadol ( $G_4$ ).

Momento	$f (\bar{x} \pm \text{EPM})$							
	$G_1$		$G_2$		$G_3$		$G_4$	
	$\bar{x} \pm \text{EPM}$	Md	$\bar{x} \pm \text{EPM}$	Md	$\bar{x} \pm \text{EPM}$	Md	$\bar{x} \pm \text{EPM}$	Md
M0	63 ± 19	38 aA	76 ± 14	66 aA	80 ± 21	60 aA	61 ± 18	37 aA
M1	32 ± 5	30 aA	37 ± 2	40 aAB	35 ± 5	31 aAB	43 ± 11	34 aAB
M2	19 ± 2	18 aA	21 ± 3	21 aABC	15 ± 1	15 aABC	21 ± 3	19 aABC
M3	18 ± 2	18 aA	24 ± 8	18 aABC	14 ± 1	14 aC	16 ± 1	17 aC
M4	23 ± 3	21 aA	24 ± 4	21 aABC	16 ± 2	15 aBC	26 ± 4	22 aABC
M5	25 ± 4	22 aA	20 ± 3	17 aC	18 ± 3	15 aABC	33 ± 5	30 aA
M6	21 ± 3	23 aA	18 ± 2	16 aC	16 ± 2	15 aBC	24 ± 3	22 aABC
M7	20 ± 2	19 abA	18 ± 1	18 aBC	15 ± 2	13 aC	23 ± 2	21 aABC
M8	20 ± 2	20 aA	21 ± 3	20 aABC	15 ± 2	13 aC	23 ± 2	21 aABC

Medianas (Md) seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 3. Média ( $\bar{x}$ ) e erro padrão da média (EPM) da temperatura retal (TR), em graus Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), de cadelas submetidas à anestesia peridural com ropivacaína isolada ( $G_1$ ), ropivacaína associada à morfina ( $G_2$ ), ropivacaína associada ao butorfanol ( $G_3$ ) e ropivacaína associada ao tramadol ( $G_4$ ).

Momento	TR ( $\bar{x} \pm \text{EPM}$ )			
	$G_1$	$G_2$	$G_3$	$G_4$
M <sub>0</sub>	38,7 ± 0,2aA	39,1 ± 0,2 aA	39,2 ± 0,1 aA	39,0 ± 0,2 aA
M <sub>1</sub>	38,7 ± 0,2aA	38,8 ± 0,3 aA	38,9 ± 0,1 aA	38,9 ± 0,1 aA
M <sub>2</sub>	37,8 ± 0,1aB	37,5 ± 0,3 aB	37,6 ± 0,3 aB	37,9 ± 0,2 aB
M <sub>3</sub>	37,2 ± 0,1aC	37,1 ± 0,2 aBC	37,3 ± 0,3 aB	37,5 ± 0,2 aBC
M <sub>4</sub>	37,2 ± 0,1aBC	37,1 ± 0,3 aBC	37,2 ± 0,3 aB	37,4 ± 0,2 aCD
M <sub>5</sub>	37,2 ± 0,1aBC	37,0 ± 0,2 aBC	37,2 ± 0,3 aB	37,3 ± 0,2 aCD
M <sub>6</sub>	37,2 ± 0,1aC	36,8 ± 0,3 aC	37,2 ± 0,4 aB	37,2 ± 0,1 aCD
M <sub>7</sub>	37,0 ± 0,1aC	36,8 ± 0,2 aC	37,2 ± 0,3 aB	37,1 ± 0,1 aD
M <sub>8</sub>	37,0 ± 0,1aC	36,7 ± 0,2 aC	37,3 ± 0,3 aB	37,1 ± 0,1 aD

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os valores da pressão arterial sistólica no momento basal ( $M_0$ ) apresentaram-se elevados o que pode ser parcialmente explicado em decorrência da resistência dos animais à contenção física durante o exame pré-anestésico. Após a MPA houve a redução destes valores certamente relacionado ao efeito da acepromazina que, por bloqueio dos receptores  $\alpha$ -1-adrenérgicos periféricos, pode causar redução dos valores da pressão arterial (19). Nos grupos nos quais se utilizou a ropivacaína isolada ou associada à morfina ou ao tramadol foi observada elevação significativa da PAS a partir do momento  $M_4$  nos  $G_1$  e  $G_4$  e em  $M_5$  no  $G_2$  devido, provavelmente, à sensação de dor apresentada pelos animais neste momento, onde foi realizado o resgate anestésico, para que se pudesse prosseguir com o procedimento cirúrgico. Nos animais do grupo da ropivacaína associada ao butorfanol, apesar de existir diferença significativa entre alguns momentos do grupo, os valores da PAS mantiveram-se dentro da

faixa de normalidade para a espécie, concordando com os achados de Maia (18) que, ao utilizar butorfanol associado à ropivacaína pela via peridural, não observou alterações cardiovasculares significativas. Neste grupo, provavelmente devido à progressão mais cranial do bloqueio, 75% dos animais não apresentaram aumento da pressão o que evidenciou o maior bloqueio sensitivo do butorfanol (tabela 4).

Tabela 4. Média ( $\bar{x}$ ) e erro padrão da média (EPM) da pressão arterial sistólica (PAS), em milímetros de mercúrio (mmHg), de cadelas submetidas à anestesia peridural com ropivacaína isolada (G<sub>1</sub>), ropivacaína associada à morfina (G<sub>2</sub>), ropivacaína associada ao butorfanol (G<sub>3</sub>) e ropivacaína associada ao tramadol (G<sub>4</sub>).

Momento	PAS ( $\bar{x} \pm$ EPM)			
	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	G <sub>4</sub>
M <sub>0</sub>	151 ± 13 aABCD	135 ± 5aAB	150 ± 6aA	148 ± 8aABCD
M <sub>1</sub>	118 ± 9aD	116 ± 5aAB	121 ± 5aAB	120 ± 7aCD
M <sub>2</sub>	123 ± 6aD	111 ± 7aB	103 ± 5aC	113 ± 4aD
M <sub>3</sub>	132 ± 7aCD	114 ± 7aAB	114 ± 6aAB	119 ± 6aCD
M <sub>4</sub>	176 ± 18aAB	119 ± 7aAB	121 ± 4aAB	174 ± 15aA
M <sub>5</sub>	184 ± 15aA	144 ± 16aA	126 ± 5aB	172 ± 16aAB
M <sub>6</sub>	167 ± 14aABC	132 ± 13 aAB	120 ± 4aAB	154 ± 11aABC
M <sub>7</sub>	155 ± 12aABC	125 ± 12 aAB	120 ± 4aAB	149 ± 12aABCD
M <sub>8</sub>	145 ± 13aBCD	116 ± 6 aAB	112 ± 4aAB	133 ± 9aBCD

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Com relação à concentração de bicarbonato de sódio arterial (HCO<sub>3</sub>) observou-se um aumento significativo ( $20,4 \pm 0,7$  mmol/L) no momento final, em relação ao momento basal ( $18,8 \pm 0,5$  mmol/L) no grupo da ropivacaína associada à morfina, discordando dos achados de Maia (18) que não encontrou alteração do bicarbonato arterial ao utilizar morfina associada à ropivacaína pela via peridural. O pH arterial aumentou de maneira gradativa apenas no grupo que recebeu ropivacaína isolada (7,342; 7,365 e 7,378), porém não ultrapassando os valores considerados normais para a espécie, não chegando, portanto, a ocasionar distúrbios metabólicos consideráveis. Já Duke et al. (25) descreveram a ocorrência de redução do pH arterial em relação ao momento basal, 150 minutos após a injeção peridural de ropivacaína 0,5% em cães. Guedes et al. (26) também observaram diminuição significativa no pH ao utilizarem tramadol na dose de 1,0mg/kg pela via peridural em cães.

Durante o procedimento os animais mantiveram-se em respiração espontânea, sem suplementação de oxigênio. A pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO<sub>2</sub>) não apresentou diferença estatística significativa, entretanto seus valores encontraram-se discretamente abaixo dos considerados normais para a espécie sem, contudo, repercussão clínica relevante. Esses achados discordam de Troncy et al. (27) que encontraram aumento da pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO<sub>2</sub>) ao utilizarem morfina associada ou não à bupivacaína pela via peridural em cães. Guedes et al. (26), entretanto, observaram um aumento significativo dos valores da PaCO<sub>2</sub> no período trans-anestésico de cães submetidos à injeção peridural de tramadol, o que difere dos resultados do presente estudo. Avaliando-se os valores da pressão parcial de oxigênio arterial (PaO<sub>2</sub>) não foram encontradas alterações em nenhum dos grupos estudados, discordando dos resultados de Ischy et al. (4) que observaram discreta depressão respiratória ao associar butorfanol à lidocaína pela via peridural. Os autores

Torske e Dyson (28) mesmo ao detectarem depressão respiratória em decorrência da utilização da morfina pela via peridural, a consideraram sem relevância clínica. Guedes et al. (26) ao utilizarem tramadol pela via peridural em cães anestesiados com halotano, não observaram alterações significativas das funções hemodinâmica e respiratória.

O período de latência foi de  $3,9 \pm 0,5$ ;  $3,3 \pm 0,5$ ;  $3,6 \pm 0,8$  e  $4,1 \pm 0,7$  minutos para os grupos  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$  e  $G_4$ , respectivamente, não apresentando diferença estatística entre si. Sendo, todavia, significativamente inferiores aos descritos por Maia (18) que relatou uma latência de  $6,1 \pm 1,8$  e  $6,5 \pm 0,9$  minutos para a ropivacaína associada à morfina e ao butorfanol, respectivamente.

A associação da ropivacaína à morfina apresentou períodos de recuperação superiores aos demais grupos provavelmente devido à sua natureza hidrofílica, propriedade pela qual sua taxa de absorção e distribuição sistêmica seria reduzida, segundo citações de Day et al. (21). A recuperação da dor superficial, recuperação do tônus postural normal e tempo de cirurgia não apresentaram diferenças significantes entre os quatro grupos estudados. Esses achados corroboram com Lawhorn et al. (29) quando relatam que o butorfanol associado à bupivacaína diminui a latência e aumenta a duração da analgesia (tabela 5).

Tabela 5. Média ( $\bar{x}$ ) e erro padrão da média (EPM) dos períodos de latência e duração de ação, em minutos (min.), de cadelas submetidas à anestesia peridural com ropivacaína isolada ( $G_1$ ), ropivacaína associada à morfina ( $G_2$ ), ropivacaína associada ao butorfanol ( $G_3$ ) e ropivacaína associada ao tramadol ( $G_4$ ).

Variável	Latência / Duração ( $\bar{x} \pm$ EPM)			
	$G_1$	$G_2$	$G_3$	$G_4$
Tônus de esfíncter anal	$1,0 \pm 0,0a$	$1,6 \pm 0,3a$	$1,4 \pm 0,3a$	$1,1 \pm 0,1a$
	$319,8 \pm 28,4ab$	$353,0 \pm 26,7a$	$230,3 \pm 15,7b$	$280,6 \pm 27,7ab$
Dor superficial	$3,9 \pm 0,5a$	$3,3 \pm 0,5a$	$3,6 \pm 0,8a$	$4,1 \pm 0,7a$
	$375,8 \pm 54,8a$	$447,3 \pm 41,0a$	$308,5 \pm 24,3a$	$353,4 \pm 43,1a$
Tônus cauda	$1,9 \pm 0,7a$	$1,5 \pm 0,2a$	$1,4 \pm 0,3a$	$1,4 \pm 0,2a$
	$298,0 \pm 31,1ab$	$331,3 \pm 29,5a$	$222,1 \pm 12,5b$	$214,0 \pm 21,8b$
Tônus postural	$3,4 \pm 0,8a$	$2,9 \pm 0,5a$	$2,8 \pm 0,4a$	$3,4 \pm 0,6a$
	$360,8 \pm 33,8a$	$404,5 \pm 31,0a$	$322,5 \pm 37,7a$	$278,6 \pm 36,5a$
Recuperação da deambulação normal	$391,5 \pm 28,9ab$	$495,6 \pm 32,1a$	$370,8 \pm 24,7b$	$357,5 \pm 37,4b$

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A maioria dos animais apresentou grau de sedação avaliado como leve durante o momento  $M_1$  nos quatro grupos avaliados (100; 87,5; 100 e 75%, nos grupos  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$  e  $G_4$ , respectivamente). Esse efeito deve-se ao efeito da MPA administrada 15 minutos antes, discordando, porém de Kojima et al. (30); Wagner et al. (31) que relatam sedação moderada pelo efeito da acepromazina. Tal discordância de resultados pode ser justificada pelo temperamento e comportamento diferenciados dos animais, por serem de proprietários diferentes, e manifestarem medo e apreensão durante a manipulação, além da subjetividade que envolve este tipo de avaliação.

No grupo no qual o butorfanol foi associado à ropivacaína, o efeito sedativo observado desde o  $M_4$  ao momento final (moderado a profundo) deveu-se, provavelmente, ao efeito sistêmico do opióide, da mesma maneira que Camann et al. (32), relataram a ocorrência de sonolência em 66% e 13% de mulheres submetidas à infusão de 2,0mg de butorfanol pelas vias sistêmica e peridural, respectivamente. Um estudo realizado em gatos por Cassu e Luna (33), comparando os efeitos da associação do tramadol (2,0mg/kg) ou do butorfanol

(0,04mg/kg) à acepromazina (0,1mg/kg) resultou em um efeito sedativo mais intenso nos animais tratados com butorfanol em relação ao tramadol, concordando com os achados do presente estudo.

A partir do momento M<sub>4</sub>, entretanto, todos os animais que integraram o grupo da ropivacaína isolada ou associada à morfina ou ao tramadol necessitaram de resgate anestésico para que se pudesse prosseguir com o procedimento cirúrgico, uma vez que manifestaram sinais clínicos de dor como elevação da frequência cardíaca e pressão arterial (10, 34-36). Dos animais do grupo do butorfanol, 75% não necessitaram de resgate anestésico permanecendo, ainda assim, com grau de sedação predominantemente profundo em todos os momentos que se seguiram à administração peridural. Esse achado pode estar relacionado à progressão mais cranial do bloqueio neste grupo em relação aos demais. Maia (18), utilizando butorfanol associado à ropivacaína por via peridural também observou sedação mais intensa (60% moderada, 20% profunda e 20% leve aos 60 minutos da anestesia peridural) em relação à associação da ropivacaína à petidina ou à morfina em cães. Todos os animais deste grupo (ropivacaína + butorfanol) apresentaram-se visivelmente tranqüilos, sendo que a grande maioria (75 %) apresentou rotação do globo ocular o que evidencia um grau profundo de sedação.

## CONCLUSÕES

Concluiu-se que o período de latência da ropivacaína não sofre interferências da associação aos opióides estudados. A duração dos bloqueios sensitivo e motor foi maior no grupo da ropivacaína associada à morfina do que nos demais e a associação da ropivacaína ao butorfanol pela via peridural em cadelas permitiu a realização de cirurgias de ovariosalpingohisterectomia em 75% dos animais, com sedação pronunciada e sem necessidade de indução à anestesia geral intravenosa.

**Agradecimento** à Capes pela bolsa concedida ao Pesquisador.

Trabalho aprovado em 23 de janeiro de 2006 pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Unesp – Araçatuba, estando de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## REFERÊNCIAS

1. Cassu RN, Menezes LMB, Kanashiro C, Stevanin H. Efeitos cardiorespiratório, analgésico e neuroendócrino da anestesia epidural com lidocaína isolada ou associada ao fentanil em cadelas submetidas a ovariosalpingohisterectomia. In: Anais do 7º Encontro de Anestesiologia Veterinária; 2005, São Luís. São Luís - MA: CBCAV; 2005. p.174.
2. Klant JG, Garcia LV, Stocche RM, Reis MP. Anestesia peridural continua com ropivacaína a 0.2% associada a anestesia geral para cirurgia do abdômen superior em crianças. Rev Bras Anesthesiol. 2003;2(53):160-8.
3. Souza AP, Nunes N, Santos PSP, Nishimori CT, Paula DP, Rezende ML, et al. Alterações eletrocardiográficas e cardiovasculares promovidas pela morfina ou butorfanol em cães anestesiados pelo desflurano. MedVep. 2004;2(7):168-75.

4. Ischy HM, Luna SPL, Gonçalves RC, Cruz ML. Uso da lidocaína isolada ou associada à quetamina ou ao butorfanol, em cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia. *Rev Bras Cienc Vet.* 2002;9(1):134-6.
5. Skarda RT. Local and regional anesthetic and analgesic techniques: dogs. In: Thurmon JC, William JT, Benson GJ. *Lumb & Jones veterinary anesthesia*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. cap. 16A, p. 426-47. 6. Jones RS. Epidural analgesia in the dog and cat. *Vet J.* 2001;161(2):123-31.
7. Hendrix PK, Hansen B. Acute pain management. In: Bonagura JD. *Kirki's current veterinary therapy XIII: small animal practice*. 9ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000. p.57-61.
8. Mastrocinque S, Fantoni DT. Modulação da resposta neuroendócrina à dor pós-operatória em cães (Estudo comparativo entre tramadol e morfina). *Clin Vet.* 2001;6(31):25-9.
9. Troncy E, Besner JG, Charbonneau R, Cuvelliez SG, Blais D. Pharmacokinetics of epidural butorfanol in isoflurane-anesthetized dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 1996;19(4):268-73.
10. Taylor R, Mcgehee R. *Manual of small animal postoperative care*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995.
11. James MFM, Heijke SAM, Gordon PC. Intravenous tramadol versus epidural morphine for postthoracotomy pain relief: A placebocontrolled double-blind trial. *Anesth Analg.* 1996;83(1):87-91.
12. Baraka A, Jabbour S, Ghabash M, Nader A, Khoory G, Sibai A. A comparison of epidural tramadol and epidural morphine for postoperative analgesia. *Can J Anaesth.* 1993;40(4):308-13.
13. Campagnol D, Luna SPL, Monteiro ER, Lopes MD, Prestes NC. Efeitos cardiorespiratórios e analgésico da clonidina e do tramadol associados à lidocaína, em anestesia epidural de cães. *Rev Bras Cienc Vet.* 2002;9(1):286-8.
14. Chrubasik J, Chrubasiks S, Martin E. The ideal epidural opioid – fact or fantasy? *Eur J Anaesthesiol.* 1993;10(2):79-100.
15. Valadão CAA, Duque JC, Farias A. Administração epidural de opióides em cães. *Cienc Rural.* 2002;32(2):347-55.
16. Pibarot P, Dupuis J, Grisneaux E, Cuvelliez 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;211(4):438-44.
17. SAS Institute Inc. *SAS OnlineDoc®, Version 8*. Cary - NC: SAS Institute Inc.; 1999.
18. Maia CAA. Avaliação cardiorespiratória e analgésica da ropivacaína associada à morfina, petidina ou butorfanol administrados pela via peridural em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2006.
19. Fantoni DT, Cortopassi SRG. *Anestesia em cães e gatos*. São Paulo: Roca; 2002.

20. Valverde A, Dyson DH, Cochshutt JR, McDonnell WN, Valliant AE. Comparison of the hemodynamic effects of halothane alone and combined with epidurally administered morphine for anesthesia in ventilated dogs. *Am J Vet Res.* 1991;52(3):505-9.
21. Day TK, Pepper WT, Tobias TA, Flynn MF, Clarke KM. Comparison of intra-articular and epidural morphine for analgesia following stifle arthrotomy in dogs. *Vet Surg.* 1995;24(6):522-30.
22. Brock N. Acepromazina revised. *Can Vet J.* 1994;35(6):458-9.
23. Steen PA, Michenfelder JD. Neurotoxicity of anesthetics. *Anesthesiology.* 1979;50(5):437-53.
24. Sessler DI, Ponte J. Shevering during epidural anesthesia. *Anesthesiology.* 1990;72(5):816-21.
25. Duke T, Caulkett NA, Ball SD, Remedios AM. Comparative analgesic and cardiopulmonary effects of bupivacaine and ropivacaine in the epidural space of the conscious dogs. *Vet Anaesth Analg.* 2000;27(1):13-21.
26. Guedes AGP, Natalini CC, Alves SDL, Oliveira ST. Tramadol via epidural em cães submetidos à substituição do ligamento cruzado cranial. *Cienc Rural.* 2002;32(2):345-6.
27. Troncy E, Junot S, Keroack S, Sammut V, Pibarot P, Genouvais JP, et al. Results of preemptive epidural administration of morphine with or without bupivacaine in dogs and cats undergoing surgery: 265 cases (1997-1999). *J Am Vet Med Assoc.* 2002;221(5):666-72.
28. Torske KE, Dyson DH. Epidural analgesia and anesthesia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2000;30(4):859-74.
29. Lawhorn CD, Stoner JM, Shmitz ML, Brown Junior RE, Stewart FM, Volpe P, et al. Caudal epidural butorphanol plus bupivacaine versus bupivacaine in pediatric outpatient genitourinary procedures. *J Clin Anesth.* 1997;9(2):103-8.
30. Kojima K, Nishimura R, Motoh T, Hong SH, Mochizuki M, Sasaki N. Effects of medetomidine-midazolam, acepromazine-butorphanol, and midazolam-butorphanol on induction dose of thiopental and propofol and on cardiopulmonary changes in dogs. *Am J Vet Res.* 2002;63(12):1671-9.
31. Wagner AE, Walton JA, Hellyer PW, Gaynor JS, Mama KR. Use of low doses of ketamine administered by constant rate infusion as an adjunct for postoperative analgesia in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2002;221(1):72-5.
32. Camann WR, Loferski BL, Fanciullo GJ, Stone ML, Datta S. Does epidural administration of butorphanol offer any clinical advantage over the intravenous route? *Anesthesiology.* 1992;76(2):216-20.
33. Cassu RN, Luna SPL. Tramadol. *Medvep.* 2003;1(4):295-301.
34. Haskins SC. Advantages and guidelines for using agonist opioid analgesics. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1992;22(2):360-1.

35. Hellyer PW, Gaynor JS. Acute postsurgical pain in dogs and cats. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1998;20(2):140-53.
36. Lascelles D, Waterman A. Analgesia in cats. *In Pract.* 1997;19(4):203-13.

**Recebido em: 27/02/12**

**Aceito em: 20/11/12**

## AVALIAÇÃO SOROLÓGICA PARA *Neospora caninum* EM PROPRIEDADES DE BOVINOS LEITEIROS COM ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS

Helio Langoni<sup>1</sup>  
Aristeu Vieira da Silva<sup>2</sup>  
Satie Katagiri<sup>3</sup>  
Franki Cagnini<sup>4</sup>  
Claudia Mello Ribeiro<sup>4</sup>

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de bovinos leiteiros soropositivos para *Neospora caninum* e a associação com alterações reprodutivas. Para isso, foram obtidos soros de 94 fêmeas bovinas de 19 propriedades localizadas na Mesorregião do Sudoeste do Paraná e coletados dados referentes à eficiência reprodutiva. Empregou-se a reação de imunofluorescência indireta para a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* e utilizaram-se os testes Qui-quadrado e Exato de Fisher para análise dos resultados. Detectou-se que a soroprevalência de *N. caninum* foi de 24%, com 23 animais positivos. Os títulos de anticorpos variaram entre 25 e 400. Dentre os animais positivos, 61% apresentavam problemas reprodutivos. O principal problema reprodutivo apresentado pelas fêmeas bovinas soropositivas foi o retorno ao cio, seguido de abortamento, demonstrando que a neosporose bovina tem implicações sobre os parâmetros reprodutivos em bovinos leiteiros com grande impacto econômico sobre a criação.

**Palavras-chave:** *Neospora caninum*, bovino, abortamento, repetição de cio, investigação diagnóstica.

### SEROLOGICAL EVALUATION FOR *Neospora caninum* IN FARMS WITH DAIRY CATTLE SHOWING REPRODUCTIVE ALTERATIONS

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the frequency of dairy cattle seropositive to *Neospora caninum* and investigates their association with the reproductive problems. Serum samples were obtained from 94 cows from 19 farms located in the middle region of the Southwest of Paraná and data were collected regarding the reproductive efficiency. Indirect immunofluorescence reaction for the detection of *N. caninum* were applied and used the chi-square and Fisher exact test to analyze the results. Of the total samples, it was obtained a prevalence of 24%, with 23 positive animals. The antibody titers ranged from 25 to 400. Among the positive animals, 61% had reproductive problems. The main reproductive problem presented by the female bovine positive was the return to estrus, followed by abortion, showing that the bovine neosporosis has implications for the reproductive parameters in dairy cattle with great economic impact on the creation.

**Keywords:** *Neospora caninum*, bovine, abortion, return to estrus, diagnostic investigation.

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

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Feira de Santana

<sup>3</sup> Universidade Federal de Sergipe

<sup>4</sup> União do Ensino do Sudoeste do Paraná

## EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE *Neospora caninum* EN PROPIEDADES DE BOVINOS LECHEROS CON ALTERACIONES REPRODUCTIVAS

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la frecuencia de bovinos lecheros seropositivos a *Neospora caninum* y su asociación con alteraciones reproductivas. Para esto, fueron obtenidos sueros de 94 hembras bovinas de 19 propiedades de la región del suroeste Paranaense y fueron colectados datos referentes a su eficiencia reproductiva. Fue utilizada inmunofluorescencia indirecta para la identificación de anticuerpos anti-*N. caninum* y para el análisis de los resultados, las pruebas de Chi-cuadrado de Fisher. Se detectó una seroprevalencia de 24% para *N. caninum*, con 23 animales positivos. Los títulos de anticuerpos variaron entre 25 y 400. Entre los animales positivos, 61% presentaron problemas reproductivos. El principal problema reproductivo presentado por las hembras bovinas seropositivas fue el retorno al celo, seguido de aborto, lo que demuestra que la neosporosis bovina afecta los parámetros reproductivos en los bovinos lecheros con gran impacto económico sobre la crianza.

**Palabras claves:** *Neospora caninum*, bovino, aborto, repetición de celo, diagnóstico.

### INTRODUÇÃO

A neosporose bovina é uma enfermidade amplamente disseminada pelo mundo e que tem sido associada a casos de abortamento esporádico, endêmico e epidêmico em bovinos, causando perdas econômicas consideráveis (1, 2). Não há estudos estimando as reais perdas da pecuária bovina leiteira sobre os danos agregados à neosporose. O impacto econômico depende, além do valor dos fetos abortados, dos custos indiretos com assistência veterinária e testes diagnósticos, aumento do tempo de lactação e do intervalo entre partos, queda na produção de leite e descarte de animais (3, 4).

A transmissão vertical é a principal forma de disseminação de *N. caninum* em bovinos e o abortamento é o sinal clínico mais evidente. Porém, a patogenia desta enfermidade nos bovinos é complexa e ainda não é totalmente esclarecida uma vez que alguns animais têm abortamento e outros não (1). Nos animais infectados naturalmente, a imunidade adquirida contra a infecção antes da gestação não é suficiente para prevenir a transmissão transplacentária de *N. caninum* para o feto. Vários estudos usando testes sorológicos demonstraram que fêmeas soropositivas abortam mais do que as fêmeas soronegativas (3, 4). De grande importância epidemiológica são as fêmeas infectadas verticalmente, pois estas possuem um risco maior de apresentar abortamento comparado àquelas nascidas de mães soronegativas, mantendo o agente no rebanho por gerações (5).

Dentre os métodos diagnósticos que têm sido empregados para detecção da infecção por *N. caninum*, estão os testes sorológicos que têm contribuído para prover informações sobre a epidemiologia da neosporose bovina. No Brasil, foi relatada uma relação entre a presença de anticorpos contra *N. caninum* e o histórico de abortamento no Estado de Pernambuco (6) e no Noroeste do Estado do Paraná (7). Entretanto, Ogawa et al. (8) não observaram nenhuma associação entre soropositividade e abortamentos em rebanhos leiteiros oriundos também da região Noroeste do Paraná. Diante do exposto, verifica-se a importância de mais estudos epidemiológicos que permitam conhecer melhor a patogenia da neosporose bovina, principalmente suas implicações na performance reprodutiva de bovinos leiteiros. O objetivo deste estudo foi avaliar a soroprevalência de anticorpos para *N. caninum* e verificar a associação desta enfermidade com parâmetros reprodutivos em fêmeas bovinas.

## MATERIAL E MÉTODOS

No período de agosto a novembro de 2010 foram amostradas aleatoriamente dezenove propriedades leiteiras, com sistema semi-intensivo, situadas no Município de Verê, Mesorregião do Sudoeste do Paraná, Brasil para coleta de amostras de sangue e pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*. Em cada propriedade foram coletadas amostras de sangue de 10% das vacas em produção. Os animais foram amostrados ao acaso, totalizando 94 fêmeas bovinas da raça holandesa, girolanda ou jersey. As amostras foram centrifugadas a 1650g por 10 minutos, congeladas a - 20°C e em seguida foram encaminhadas para o Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses (NUPEZO) do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, São Paulo. Empregou-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a pesquisa de anticorpos anti- *N. caninum*, segundo Dittrich (9). A cepa NC-1 de *N. caninum* mantida *in vitro* foi usada como antígeno. O conjugado usado foi um anti-IgG bovino e o ponto de corte utilizado foi a diluição 1:25. Para a titulação, foram realizadas diluições em dobro: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800. Nos casos de ocorrência de reação na última diluição testada, as amostras foram submetidas a novas diluições, para obtenção do título final. Os resultados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado e o teste Exato de Fisher.

As propriedades utilizavam o sistema de monta natural como forma de reprodução e, segundo os proprietários, mantinham programa de vacinação contra leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina e brucelose. Em cada propriedade foi aplicado um questionário para obter informações sobre parâmetros reprodutivos dos animais avaliados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anticorpos contra *N. caninum* foram encontrados em 24% das fêmeas bovinas, pertencentes a treze das dezenove propriedades estudadas (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência absoluta, frequência relativa e intervalo de confiança dos resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos.

RIFI	Frequência absoluta	Frequência relativa	Intervalo de Confiança 95%
Negativos	71	75,50	65,50 – 83,80
Positivos	23	24,50	16,20 – 34,40
Total	94	100,00	-

Nesse estudo, utilizou-se a RIFI para detectar a presença de anticorpos para *N. caninum* em bovinos, pois estudos epidemiológicos em diversos hospedeiros têm demonstrado que este teste apresenta uma alta sensibilidade para *N. caninum* e uma baixa ocorrência de reação cruzada entre *N. caninum* e *Toxoplasma gondii* (10, 11). Os títulos de anticorpos variaram entre 25 e 400 (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência absoluta, frequência relativa e intervalo de confiança dos resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), segundo o título, para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos.

Títulos de anticorpos	Frequência absoluta	Frequência relativa	Intervalo de confiança 95%
Negativos	71	75,5	65,5 – 83,8
25	6	6,4	2,4 – 13,4
50	10	10,6	5,2 – 18,7
100	4	4,3	1,2 – 10,5
200	2	2,1	0,3 – 7,5
400	1	1,1	0,0 – 5,8
Total	94	100,0	-

Estes resultados corroboram com os encontrados por Camillo et al. (12) que constataram uma prevalência de 24% de neosporose bovina na Mesorregião do Sudoeste Paranaense, isto é, na mesma região onde se realizou este estudo.

Entretanto, resultados de outros dois estudos realizados, também no Estado do Paraná, divergem dos reportados aqui. Em um desses estudos, Santos et al. (7) constataram uma prevalência bem menor de fêmeas infectadas (14%). Os autores utilizaram a RIFI para detecção de anticorpos contra *N. caninum*, porém estipularam um ponto de corte  $\geq 200$ . No segundo estudo, Marques et al. (13) observaram que 15% das fêmeas bovinas de corte estudadas eram soropositivas para *N. caninum*, mas a detecção dos anticorpos foi feita por outra técnica sorológica, o teste ELISA.

Outro fator importante que deve ser considerado na análise dos estudos de prevalência da neosporose bovina é que existem evidências de que essa enfermidade é mais prevalente nos bovinos leiteiros do que nos bovinos de corte (14). Isso justifica a maior prevalência da neosporose bovina encontrada neste estudo quando comparada com a prevalência obtida por Marques et al. (13). Portanto, para a avaliação de estudos sobre a soroprevalência de *N. caninum* deve-se ter cautela, levando em consideração a raça, o teste sorológico empregado e o ponto de corte usado para se estimar a prevalência da neosporose bovina.

Alterações reprodutivas foram observadas nos animais soropositivos para *N. caninum* (Tabela 3). As principais alterações foram retorno ao cio (Tabela 4) e abortamento (Tabela 5).

Tabela 3. Associação entre os resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos, e o relato de problemas reprodutivos.

Ocorrência de problemas reprodutivos	Negativo		Positivo		Total	
	N	%	N	%	N	%
Não	59	95,2	3	4,8	62	66,7
Sim	12	38,7	19	61,3	31	33,3
Total	71	76,3	22	23,7	93	100,0

N= Número; %=Porcentagem

Alterações reprodutivas têm sido associadas à neosporose bovina em vários estudos. O abortamento é considerado o principal sinal clínico desta enfermidade, mas morte embrionária e mumificação fetal também foram reportadas (15, 16). O abortamento é definido como a interrupção da gestação durante o período fetal, que se inicia após 42 dias de gestação e se encerra no término da gestação dos bovinos. Antecedendo este período, ocorre o período embrionário que se inicia na concepção e termina nos estágios finais da diferenciação sexual, por volta de 42 dias na espécie bovina (5). A morte que ocorre no período embrionário

ocasiona a regressão funcional e estrutural do corpo lúteo. Esse evento fisiológico determina o início de um novo ciclo estral, e o animal manifesta o cio novamente (17).

Tabela 4. Associação entre os resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos, e o relato de retorno ao cio.

Repetição de cio	Negativo		Positivo		Total	
	N	%	N	%	N	%
Não	64	91,4	6	8,6	70	75,3
Sim	7	30,4	16	69,6	23	24,7
Total	71	76,3	22	23,7	93	100

N= Número; %=Porcentagem

Tabela 5. Associação entre os resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros de bovinos, e o relato de abortamentos.

Ocorrência de abortamento	Negativos		Positivos		Total	
	N	%	N	%	N	%
Não	66	80,5	16	19,5	82	88,2
Sim	5	45,5	6	54,5	11	11,8
Total	71	76,3	22	23,7	93	100

N= Número; %=Porcentagem

De acordo com os resultados obtidos neste estudo estão Andreotti et al. (16) que concluíram que há uma significativa correlação entre não-concepção e a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos. Macaldowie et al. (18) relataram que *N. caninum* pode ser responsável pela morte embrionária na fase inicial da gestação, causando um aumento do índice de retorno ao cio nos animais. Além disso, Kamga-Waladjo et al. (2) verificaram que vacas infectadas por *N. caninum* requerem um número maior de inseminações para conceberem do que as soronegativas, indicando que a morte embrionária pode ocorrer em fêmeas bovinas infectadas por *N. caninum*.

Neste estudo, constatou-se também uma associação entre soropositividade e o histórico de abortamento. Dentre as seis fêmeas soropositivas que apresentaram abortamento, quatro delas apresentaram no primeiro trimestre de gestação e outras duas, no segundo trimestre. López-Gatius, Pabón e Almería (5) relataram que a probabilidade de ocorrer o abortamento em fêmeas soropositivas é 19% maior em relação àquelas soronegativas, contudo, verificaram que o abortamento ocorreu principalmente no segundo trimestre de gestação.

Semelhante ao que ocorre com *Toxoplasma gondii*, a chance de ocorrer a transmissão de *N. caninum* para o feto aumenta com o tempo da gestação, mas *N. caninum* pode também ser responsável pela morte fetal no início da gestação resultando em problemas de fertilidade e retorno ao cio nas fêmeas bovinas (19). No primeiro trimestre da gestação o feto bovino é incapaz de responder imunologicamente contra *N. caninum* e por esta razão ele é vulnerável a infecção pelo parasita e sua sobrevivência pode tornar improvável (20), o que justifica o retorno ao cio e o abortamento observado nas quatro fêmeas bovinas estudadas.

Em torno de 100-150 dias, o feto começa a tornar capaz de reconhecer antígenos e produzir uma resposta imunológica contra *N. caninum*, no entanto, esta resposta pode não ser efetiva contra o parasita e o feto pode morrer durante a infecção, resultando em abortamento neste período, como verificado nas duas fêmeas analisadas. Somente no terceiro trimestre da gestação o feto é capaz de produzir uma resposta efetiva contra o parasita. Desta forma, a

maioria das transmissões neste período resulta no nascimento de bezerros clinicamente saudáveis, mas persistentemente infectados (19).

Outro fator importante que pode ter contribuído para o maior número de abortamentos no primeiro trimestre observado neste estudo é que durante o primeiro trimestre de gestação, a fêmea bovina produz baixos níveis de progesterona. Altos níveis de progesterona são detectados após 150 dias de gestação e estão relacionados à indução de uma resposta imune Th2 com produção de citocinas, como interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10) que garantem o desenvolvimento do feto e a manutenção da gestação (19, 20).

Conclui-se que a neosporose bovina pode ter implicações negativas sobre os parâmetros reprodutivos de bovinos leiteiros causando retorno ao cio e abortamento, principalmente no primeiro trimestre da gestação. Porém, é necessário realizar uma triagem sorológica nas propriedades avaliadas para as outras enfermidades como leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina e brucelose, pois estas também causam alterações reprodutivas em bovinos, para que se possa inferir corretamente sobre a participação de *N. caninum* em alterações reprodutivas da população estudada.

## REFERÊNCIAS

1. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev. 2007;20:323-67.
2. Kamga-Waladjo AR, Gbati OB, Kone P, Lapo RA, Chatagnon G, Bakou SN, et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies and its consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar-Senegal, West Africa. Trop Anim Health Prod. 2010;42:953-9.
3. Thurmond MC, Hietala SK. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. Am J Vet Res. 1996;57:1559-62.
4. Hernández J, Risco C, Donovan A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. J Am Vet Med Assoc. 2001;219:632-5.
5. López-Gatius F, Pabón M, Almería S. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. Theriogenology. 2004;62:606-13.
6. Silva MIS, Almeida MAO, Mota RA, Pinheiro Junior JW, Rabelo SSA. Fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. Cienc Anim Bras. 2008;9:455-61.
7. Santos APME, Navarro LT, Bracarense APFRL, Freire RL, Marana ERM, Logawa L, et al. Dairy cow abortion associated with *Neospora caninum* and other infectious agents. Arq Bras Med Vet Zootec. 2005;57:545-7.
8. Ogawa L, Freire RL, Vidotto O, Gondim LFP, Navarro IT. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. Arq Bras Med Vet Zootec. 2005;57:312-6.
9. Dittrich RL. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e equinos no estado do Paraná – Brasil [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2002.

10. De Souza LM, Nascimento AA, Furuta PI, Basso LMS, Silveira DM, Costa AJ. Antibodies for *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes from São Paulo State, Brazil. *Semin Cienc Agrar*. 2001;22:39-48.
11. Haddad JP, Dohoo IR, Vanleewen JA. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle—a Canadian perspective. *Can Vet J*. 2005;46:230-43.
12. Camillo G, Cadore G, Cezar AS, Toscan G, Bräunig P, Sangioni LA, et al. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010;62:1511-3.
13. Marques FA, Headley AS, Figueredo-Pereira V, Taroda A, Barros LD, Cunha IA, et al. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). *Parasitol Res*. 2011;108:1015-9.
14. Sartor IF, Garcia Filho A, Vianna LC, Pituco EM, Dal Pai V, Sartor R. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. *Arq Inst Biol*. 2005;72:413-8.
15. Ghanem ME, Suzuki T, Akita M, Nishibori M. *Neospora caninum* and complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification. *Can Vet J*. 2009;50:389-92.
16. Andreotti R, Barros JC, Pereira AR, Oshiro LM, Cunha RC, Figueiredo Neto LF. Associação entre soropositividade para *Neospora caninum* e o desempenho reprodutivo de novilhas de corte no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010;19:119-23.
17. Marques VB, Bertan CM, Almeida AB, Meirelles FV, Papa PC, Binelli M. Interferon-tau and pregnancy recognition in cattle. *Rev Bras Reprod Anim*. 2007;31:479-88.
18. Macaldowie C, Maley SW, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Buxton D, et al. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J Comp Pathol*. 2004;131:142-56.
19. Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, et al. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;108:29-36.
20. Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol*. 2006;134:267-89.

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

**Aceito em: 10/12/12**

## ACEITABILIDADE DE IOGURTE DE LEITE DE OVELHA COM ADIÇÃO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.)

Natalia Santos Leal<sup>1</sup>  
Francy Zambrano<sup>2</sup>  
Luciane do Carmo Seraphim<sup>1</sup>  
Lucas Schimidt Dibbern<sup>1</sup>  
Luis Carlos Ferreira de Almeida<sup>3</sup>  
Simone Fernandes<sup>4</sup>

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aceitabilidade de uma formulação de iogurte de leite de ovelha adicionado com alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). Foram aplicados 162 questionários com perguntas sobre hábito de consumo e características do produto. A avaliação foi realizada com 200 provadores e os valores dos índices de aceitabilidade foram superiores a 70%. A análise de fatores, processada com o método de componentes principais, conseguiu reter, em cinco fatores, 66,1% da variância contida na variáveis originais e após rotação dos fatores pelo método varimax permitiu identificar associação entre sabor, hábito de consumo, preço e características de valor nutricional do iogurte.

**Palavras-chave:** produtos lácteos, fermentação láctica, pequenos ruminantes, análise de fatores

## ACCEPTABILITY OF YOGURT OF SHEEP'S MILK WITH ADDITION OF ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis* L.)

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the acceptability of a formulation of sheep's milk yogurt with addition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Was applied 162 questionnaires with questions about consumer habits and product characteristics. The evaluation was conducted with 200 panelists and acceptability index values were above 70%. Factor analysis, processed with the method of principal components, managed to hold on five factors, 66.1% of the variance contained in the original variables and after rotation the factors by the Varimax method allowed to identify associations between taste, consumption habits, price and nutritional characteristics of yogurt.

**Keywords:** dairy products, lactic fermentation, small ruminants, factor analysis

## ACEPTABILIDAD DE YOGUR DE LECHE DE OVEJA CON ADICIÓN DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.)

### RESUMÉN

El objetivo de este estudio fue evaluar la aceptabilidad de una formulación de yogur de leche de oveja con adición de romero (*Rosmarinus officinalis* L.). Se aplicaron 162 cuestionarios con preguntas acerca de los hábitos de consumo y características del producto. La evaluación

<sup>1</sup> Aluno de graduação, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP

<sup>2</sup> Professora Colaboradora do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, FCA-UNESP, Botucatu, SP

<sup>3</sup> Professor Assistente Doutor, Campus Experimental de Registro – UNESP, Registro, SP

<sup>4</sup> Assistente Acadêmica do Departamento de Produção Animal, FMVZ-UNESP, Botucatu, SP

se levou a cabo con 200 entrevistados y los valores de índice de aceptabilidad estuvieron por encima del 70%. El análisis factorial, procesado con el método de componentes principales, logró mantener el 66,1% de la varianza contenida en las variables originales en cinco factores y, después de la rotación de los factores por el método varimax, permitió identificar asociaciones entre los hábitos de consumo, sabor, precio y valor nutricional de yogur.

**Palabras clave:** productos lácteos, fermentación ácido láctica, pequeños rumiantes, análisis factorial

## INTRODUÇÃO

Raças de ovelha como Wilermach, Lacaune e Bergamácia, já existentes na Bahia, poderão ser também utilizadas em outros estados para a produção de leite, conforme realizado na Austrália, Nova Zelândia, França, Espanha, Portugal, e Itália (1).

O leite de ovelha apresenta características inigualáveis para a elaboração de queijos finos e iogurtes, pois é mais rico do que o leite das demais espécies em quase todos os seus componentes. O leite de ovelha possui mais que o dobro do teor de gordura dos leites de vaca e cabra (2).

O iogurte é um derivado lácteo obtido pela fermentação produzida por culturas simbióticas de *Lactobacillus delbrüeckii*, *subsp. Bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. De forma geral os leites fermentados apresentam ação antagônica sobre grande número de bactérias patogênicas, são recomendados em várias doenças digestivas e ajudam na reposição da flora intestinal após uso prolongado de antibióticos (3).

Nas últimas décadas as doenças cardiovasculares (DCV) passaram a ser a principal causa de morbimortalidade nos países desenvolvidos e cada vez são mais crescentes nos países em desenvolvimento (4). Neste contexto, antioxidantes derivados de alimentos como vitaminas e compostos fenólicos têm recebido crescente atenção devido a sua função quimiopreventiva contra danos oxidativos. O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) apresenta propriedades antioxidantes atribuídas a uma variedade de isoprenóides, quinonas e diterpenos fenólicos, além de antioxidantes adicionais incluindo ácidos fenólicos e os flavonóides, capazes de prevenir a oxidação do colesterol e de ácidos graxos insaturados (5). Uma forma de consumo de alecrim é como tempero em alimentos.

Para se colocar um novo produto no mercado é necessário conhecer a aceitação do produto base pelos consumidores que pode ser avaliada pela aplicação de questionários, com perguntas sobre o perfil do consumidor e as características do produto (6).

A análise de fatores é uma técnica de análise multivariada que transforma um conjunto de variáveis num conjunto menor de variáveis independentes, com o propósito de definir a estrutura subjacente que possa existir em um conjunto de dados, identificando a estrutura das inter-relações entre um grande número de variáveis, definindo dimensões latentes comuns que são denominados fatores. Esses podem ser interpretados e compreendidos e permitem representar os dados em um número menor que as variáveis individuais originais (7). Vários são os métodos de extração de fatores e um dos mais utilizados é o método de componentes principais. Neste estudo a análise de fatores foi utilizada como exploratória.

A aceitabilidade de um produto foi definida como o grau de aceitação de um produto por um indivíduo ou população em termos de propriedades sensoriais (8).

A formulação de iogurte de leite de ovelha avaliado neste trabalho, além de nutrir, pode melhorar o funcionamento do organismo e ajudar a prevenir disfunções ou doenças, por apresentar adição de um alimento funcional como o alecrim.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aceitabilidade e os índices de aprovação, indiferença e rejeição de uma formulação de iogurte de leite de ovelha da raça Bergamácia,

adicionado de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) por análise de fatores aplicada aos resultados de uma pesquisa de consumo de iogurte.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado leite de ovelha da raça Bergamácia, coletados na área de produção de ovinos da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Produção Edgárdia da FMVZ, Campus de Botucatu-SP. Os demais materiais utilizados foram adquiridos no mercado local. Foi aplicado um questionário a 162 pessoas, alunos do curso de Veterinária, Zootecnia, Engenharia Florestal e Nutrição da UNESP (Botucatu). Esse questionário solicitou informações de nome, idade, sexo, hábito de consumo (*uma vez ao dia; mais de uma vez ao dia; uma vez por semana; mais de uma vez por semana; uma vez a cada 15 dias; mais e uma vez a cada 15 dias e eventualmente* ou nunca) e características do produto, com as opções de *concordo, nem concordo, nem discordo e discordo*, em referência as seguintes frases: o iogurte é um alimento saudável; o iogurte é um alimento nutricionalmente completo; prefiro iogurte light; o iogurte tem muita química; o iogurte é caro; prefiro sucos; consumo preferencialmente no café da manhã; consumo preferencialmente como lanche; o iogurte tem lactose; o iogurte é um produto fermentado.

Para a análise dos resultados da pesquisa de consumo, com o objetivo de verificar a existência, ou não de relação significativa da opinião quanto ao consumo de iogurte em relação *ao sexo, idade e hábito de consumo* dos respondentes foi utilizado inicialmente o teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) (9). Nas situações nas quais as frequências esperadas foram menores que 2 ou quando mais de 10% destas foram menores que 5, o valor da estatística para o teste de  $\chi^2$  foi obtido mediante simulação de Monte Carlo (10). Para a realização desse teste foram considerados como significativos resultados com p-valor <0,05.

Uma vez encontrados resultados significativos para o teste de  $\chi^2$  foi procedido um teste de resíduos padronizados de  $\chi^2$  com o intuito de determinar a importância probabilística de cada uma das relações existentes, nesse sentido, é possível identificar quais das relações na tabela de contigência contribuíram individualmente para o resultado dessa estatística (11).

Em complemento, respeitando a estrutura de dependência contida nas variáveis originais, foi realizada a análise fatorial em que os fatores foram extraídos pelo método de componentes principais (7), rotacionados pelo método VARIMAX, com o objetivo de investigar a estrutura das inter-relações existentes entre as variáveis em estudo. Foram consideradas relevantes aquelas variáveis com cargas fatoriais acima de 0,45. Uma vez que as suposições para a aplicação da análise fatorial foram atendidas, KMO igual a 0,551 e Teste de Esfericidade de Bartlett com p-valor < 0,01, foi procedida a análise fatorial. O número de fatores extraídos foi definido pelo critério da porcentagem da variância explicada. Assim foi estabelecida uma solução capaz de explicar pelo menos 60% da variância contida nas variáveis originais. As análises estatísticas foram realizadas com o software *SAS System for Windows 9.0*.

Na caracterização do leite de ovelha foram consideradas: determinação de pH, densidade (15<sup>0</sup>C), extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD) e composição centesimal (umidade, proteína, gordura, cinzas e carboidratos) (12). Os carboidratos foram calculados por diferença. Os resultados apresentados são médias de três determinações.

Para a elaboração do iogurte foram utilizados 11 litros de leite de ovelha da raça Bergamácia, coletados na área de produção de ovinos da fazenda de ensino, pesquisa e produção Edgárdia da FMVZ, Campus de Botucatu-SP. O leite foi pasteurizado artesanalmente a 65<sup>0</sup>C por 30 minutos, resfriado a 42<sup>0</sup>C e inoculado com 400mg/ litro de culturas lácticas BioRich (CHR HANSEN). A seguir foi incubado em estufa (Medicate) com controle de temperatura a 45<sup>0</sup>C durante 4 horas e resfriado em geladeira a 4<sup>0</sup>C por 48 horas, adicionado de 2 quilos (18% p/v) de açúcar e 80g (0,7% p/v) de alecrim finamente picado e homogeneizado em processador (Walita de 600W) 5 minutos.

Na análise sensorial do iogurte de leite de ovelha foi realizado Teste de aceitabilidade e calculados os índices de aprovação, rejeição e indiferença (13). O teste de aceitabilidade foi realizado na FCA da UNESP de Botucatu-SP, com painel de 200 provadores, alunos da Faculdade de Zootecnia da UNESP, Campus Botucatu. Amostras de 40 ml de iogurte de leite de ovelha adicionadas de alecrim a 4 °C foram oferecidas em copo descartável e avaliadas quanto à aparência, aroma, textura, sabor e forma global por meio de escalas hedônicas de nove pontos (9 = gostei muitíssimo, 5 = não gostei nem desgostei e 1 = desgostei muitíssimo).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados do questionário da pesquisa de consumo e do teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

Tabela 1. Resultados do questionário e do teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

Pergunta	Resposta	N	%	Idade	Sexo	Habito de consumo
				P	p	p
O iogurte é alimento fermentado	Concordo	106	65,4	0,7812*	0,4926	0,2152*
	Indiferente	44	27,2			
	Discordo	12	7,4			
O iogurte tem lactose	Concordo	118	72,8	0,3745*	0,2041*	0,1219*
	Indiferente	35	21,6			
	Discordo	9	5,6			
Consumo preferencialmente como lanche	Concordo	58	35,8	0,0895*	0,3258	0,5505*
	Indiferente	48	59,6			
	Discordo	56	34,6			
Consumo preferencialmente no café da manhã	Concordo	58	36,0	0,2135*	0,7783	0,2780*
	Indiferente	30	18,7			
	Discordo	73	45,3			
Prefiro sucos	Concordo	76	46,9	0,4300*	0,1408	<b>0,0260*</b>
	Indiferente	52	32,1			
	Discordo	34	21,0			
O iogurte é caro	Concordo	50	30,9	0,5378*	0,7043	0,3440*
	Indiferente	53	32,7			
	Discordo	59	36,4			
O iogurte tem muita química	Concordo	29	17,9	0,2394*	0,4056	0,4208*
	Indiferente	74	45,7			
	Discordo	59	36,4			
Prefiro iogurte light	Concordo	24	14,9	0,0943*	<b>0,0027*</b>	<b>0,0021*</b>
	Indiferente	25	15,5			
	Discordo	112	69,6			
O iogurte é um alimento saudável	Concordo	141	87,0	0,5756*	0,3105*	0,3158*
	Indiferente	19	11,7			
	Discordo	2	1,3			
O iogurte é um alimento nutricionalmente completo	Concordo	22	13,6	0,5327*	0,9513	0,8039*
	Indiferente	88	54,3			
	Discordo	52	32,1			
Hábito de consumo	Uma vez ao dia	21	13,0	0,5924*	0,7672	-
	Mais que uma vez ao dia	5	3,0			
	Uma vez por semana	20	12,4			
	Mais que uma vez por semana	40	24,7			
	Uma vez por quinzena	17	10,5			
	Mais que uma vez por quinzena	8	4,9			
	Eventualmente	51	31,5			

(\*) Estimativas da estatística de  $\chi^2$  obtidas mediante simulação de Monte Carlo

Somente foram significativas as variáveis relacionadas a *hábito de consumo x prefiro sucos*; *prefiro iogurte light x sexo* e *prefiro iogurte light x hábito de consumo*. Os resultados da análise de resíduos são citados a seguir:

a) *prefiro iogurte light x sexo*: a preferência pelo iogurte *light* é significativamente maior entre as mulheres do que entre os homens. Foi constatado uma preferência das mulheres (69,8% das 387 pessoas entrevistadas) pelo iogurte *diet* ou *light* (54,0%) tendo justificativa a manutenção da forma física (55,2%) (14).

b) *hábito de consumo x prefiro sucos*: os resultados mostraram diferenças significativas entre as opiniões *concordo x uma vez ao dia*; *Discordo x Mais que uma vez ao dia e indiferente x uma vez ao dia*. A análise dos resíduos mostra que a preferência por sucos se relaciona de forma inversa ao hábito de consumir iogurte, no sentido que, uma maior preferência por sucos implica em um hábito menor do consumo de iogurte e vice versa.

c) *prefiro iogurte light x hábito de consumo*: na análise de resíduos, as principais diferenças entre os valores observados e esperados se deram entre os grupos de consumo *Eventualmente e mais que uma vez ao dia* quanto à *concordância* ou não pela preferência pelo iogurte *light*. Foi observado que as pessoas que consomem iogurte diariamente têm uma preferência maior pelo iogurte *light* quando comparado àqueles que consomem apenas eventualmente.

A categoria de iogurte "*light*" tem uma grande parcela do mercado consumidor que exige produtos que confirmem benefícios à saúde (15).

Para a elaboração da Análise Fatorial deve-se garantir a homogeneidade da amostra em relação à estrutura fatorial latente. Para isso, foram eliminadas as variáveis que apresentaram correlação nos testes de independência de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): *iogurte light* e *hábito de consumo* (7).

Foram considerados 5 fatores que, conjuntamente, explicaram 66,1% da variância contida nas variáveis originais, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Resultado da análise fatorial

Componente	Autovalores		
	Total	% da variância	Variância acumulada
1	1,684	18,7	18,7
2	1,237	13,7	32,4
3	1,095	12,2	44,6
4	0,996	11,1	55,7
5	0,940	10,4	66,1

A Tabela 3 apresenta os valores das correlações das variáveis associadas aos eixos fatoriais.

Tabela 3. Valores das correlações das variáveis associadas aos eixos fatoriais

Variável	Fatores				
	F1	F2	F3	F4	F5
Iogurte é um alimento saudável	0,65*	-0,02	-0,10	-0,07	0,06
Iogurte um alimento nutricionalmente completo	0,30	-0,13	-0,20	0,04	0,81*
Iogurte tem muita química	-0,67*	0,43	-0,20	0,22	-0,03
Iogurte é caro	-0,06	-0,06	0,05	0,95*	0,00
Prefiro sucos	-0,67*	-0,21	-0,04	-0,21	-0,07
Consumo iogurte preferencialmente no café da manhã	0,47*	-0,13	-0,40	0,06	-0,59*
Consumo preferencialmente como lanche	0,08	-0,01	0,89*	0,06	-0,07
Iogurte tem lactose	0,08	0,75*	-0,17	-0,03	-0,00
Iogurte é um alimento fermentado	-0,01	0,74*	-0,18	-0,02	-0,06

O primeiro fator (F1) apresentou quatro variáveis correlacionadas. O *Iogurte é um alimento saudável* (correlação 0,65) e *prefiro preferencialmente no café da manhã* (correlação 0,47) em oposição às variáveis, *Iogurte tem muita química* (correlação -0,67) e *prefiro sucos* (correlação 0,67). Os respondentes que acreditam ser o iogurte um alimento saudável preferencialmente o *consomem no café da manhã*, estando essas respostas em oposição aos que consideram o iogurte *ter muita química* que, nesse caso, manifestam *preferir sucos*.

Apesar de a legislação brasileira permitir o uso de aditivos em iogurtes e sucos (16), é provável que os consumidores tenham a percepção de que os sucos industrializados sejam mais naturais e por isso com menor teor ou livres de aditivos quando comparados com o iogurte, o que explicaria a oposição das variáveis nesse componente.

O segundo fator (F2) associado ao conhecimento do produto apresentou duas variáveis relacionadas: *o iogurte tem lactose* (correlação 0,75) e *o iogurte é um alimento fermentado* (correlação 0,74).

O iogurte é o mais conhecido dos leites fermentados (8). Em 2009 as vendas de lácteos no varejo se mantiveram aquecidas e as maiores altas, nos preços, foram observadas nos leites fermentados, com aumento de 17,9% em relação a 2008. Já no primeiro bimestre de 2010 o crescimento nas vendas de iogurte foi de 6,6% em relação ao mesmo período de 2009. O principal ponto a destacar dessas informações se refere à migração das classes sociais D/E para a classe C por causa, principalmente, dos aumentos reais do salário mínimo e das políticas de transferência de renda, assistência social e segurança alimentar (17). No período de 1974 a 2003 houve um aumento significativo de 702% na aquisição para consumo de iogurtes no domicílio.

O terceiro fator (F3) tem unicamente como variável associada “*consumo preferencialmente como lanche*” (correlação 0,89). O preço, expresso pela variável “*iogurte é Caro*”, está associado ao quarto fator (F4) (correlação 0,95).

O quinto fator (F5) apresentou duas variáveis correlacionadas inversamente: *o iogurte é nutricionalmente completo* (correlação 0,81) em oposição à *consumo preferencialmente no café da manhã* (correlação -0,59). Para os respondentes que acreditam ser o iogurte um produto *nutricionalmente completo* não está restrito apenas à essa refeição.

Sobre o conhecimento e consumo de produtos lácteos com 183 acadêmicos, 43,5% responderam que preferiam consumir iogurte durante o lanche da tarde e 30% no café da manhã. Além disso, 35% disseram que consumiam iogurte por ser saudável/nutritivo (18).

### Avaliação da composição química do leite de ovelha

Os resultados obtidos de extrato seco total 16,37% e cinzas 1,0% se aproximam aos valores de 17,30% e 0,9% encontrados por outros autores (19, 20). A densidade do leite de ovelha analisado foi de 1,040g/ml próxima do valor médio de 1,036g/ml (21). Já o teor de gordura do leite avaliado foi de 5,1% enquanto em outro trabalho foi de 6,3% (19). Essa

diferença pode ser explicada pela variação ocasionada no período da lactação, menor no início e maior no final (21). Quanto à proteína, o teor no leite de ovelha se aproxima a 6% (22) e o valor determinado neste trabalho foi de 6,38%. O teor de umidade do leite de ovelha foi de 83,61%, ligeiramente superior ao 83,00% (23). Por outro lado, a concentração de lactose do leite foi de 3,85%, inferior à média de 5,36% (24).

A oscilação dos resultados, deve-se ao fato da composição do leite de ovelha variar com a dieta, raça, animais dentro das várias raças, paridade, sazonalidade, nutrição e condições de manipulação, condições ambientais, localização, e estágio da lactação (25). Os ovinos são entre os animais produtores de leite os que mais sofrem influência do meio ambiente, como pastagem, clima e posição geográfica (21).

### Aceitabilidade

Os índices de aceitabilidade, aprovação, indiferença e rejeição são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Índice de aceitabilidade, aprovação, indiferença e rejeição do iogurte de leite de ovelha com alecrim (*Rosmarinus officinalis* L).

Parâmetro	Média	% Aceitabilidade	% Aprovação	% Indiferença	% Rejeição
Aparência	7,10	78,83	88,50	5,50	6,00
Odor	6,83	75,83	74,00	15,50	10,50
Sabor	7,27	80,78	90,50	1,00	8,50
Textura	7,10	78,83	88,50	5,50	6,00
Avaliação Global	7,32	81,28	91,50	4,00	4,50

O produto que apresentar Índice de Aceitabilidade (IA) igual ou maior que 70% é considerado aceito pelos provadores (26), o que está de acordo com os resultados obtidos e apresentados na Tabela 4. Os resultados no teste de aceitação mostraram que a maioria das respostas dadas pelos provadores foram superiores a 6 e situaram-se nas categorias “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”, indicando que o iogurte de leite de ovelha adicionado com alecrim foi bem aceito. Estes resultados são considerados satisfatórios, uma vez que os provadores nunca haviam experimentado o iogurte de leite ovino, mostrando que além de ser um produto diferenciado, possui uma boa aceitação pelos consumidores.

### CONCLUSÕES

Da realização do teste de  $\chi^2$  com os resultados da pesquisa realizada neste trabalho é possível admitir que a preferência pelo consumo de iogurte *light* é significativamente maior entre as mulheres e as pessoas que o consomem diariamente e que a preferência pelo hábito de consumo de iogurte esta relacionada de forma inversa ao de sucos.

Foi possível identificar que para o iogurte existe uma associação entre sabor, hábito de consumo, preço, características e valor nutricional. É possível produzir iogurte adicionado de alecrim com aceitabilidade utilizando leite de ovelha da raça Bergamácia.

**Comitê de Ética: 02/08/2010**

### REFERÊNCIAS

1. Nardes REF. Caracterização de queijo Zamorano Dop sob condições de maturação acelerada por modificações na temperatura [tese]. Viçosa: Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa; 2002.

2. Ribeiro LC, Pérez JRO, Carvalho PHA, Silva FF, Muniz JA, Oliveira Jr JM, et al. Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas Santa Inês tratadas com ocitocina. Rev Bras Zootec. 2007;36:438-44.
3. Ferreira CLFF. Produtos lácteos fermentados. Aspectos bioquímicos e tecnológicos. Viçosa: Editora UFV; 2005.
4. Faludi AA, Bertolami MC. Estratégia no seguimento a longo prazo de pacientes dislipidêmicos sob tratamento farmacológico. Rev Soc Cardiol Estado São Paulo. 2005;15:546-9.
5. Pérez FL, Aranda FJ, Guillén J, Villalaín J, Micol V. Rosemary (*Rosmarinus offi cinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. Arch Biochem Biophys. 2006;453:224-36.
6. Walpole RE, Myers RH, Myers SL. Probabilidade e estatística para engenharia e ciências. 8ª ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall; 2009.
7. Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. Multivariate data analysis. New Jersey: Prentice Hall; 1995.
8. Moraes PCBT. Avaliação de iogurtes líquidos comerciais sabor morango: estudo de consumidor e perfil sensorial [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2004.
9. Dawson B, Trapp RG. Bioestatística básica e clínica. 3ª ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill; 2003.
10. Peat J, Barton B. Medical statistics: a guide to data analysis and critical appraisal. Massachusetts: Wiley John & Sons; 2005.
11. Siegel S, Castellan Jr NJ. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
12. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª ed. São Paulo: IMESP; 2005.
13. Dutcosky SD. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: Champagnat; 1996.
14. Ribeiro MM, Minim VPR, Minim LA, Arruda AC, Ceresino EB, Carneiro HCF, et al. Estudo de mercado de iogurte da cidade de Belo Horizonte/MG. Rev Ceres. 2010;57: 151-6.
15. King NA, Appleton K, Rogers PJ, Blundell J. Effects of Sweetness and energy in drinks on food intake following exercise. Physiol Behav. 1999;66:375-9.
16. Ferrarezi AC, Santos CO, Monteiro M. Avaliação crítica da legislação brasileira de sucos de fruta, com ênfase no suco de fruta pronto para beber. Rev Nutr. 2010;23:667-77.
17. Carvalho G, Pinha LC, Travassos GF. Poder de compra. Leite Deriv. 2010;19:24-8.

18. Lengler CMZ. Produtos lácteos: comparação do conhecimento e consumo por acadêmicos ingressantes e concluintes de um curso de nutrição de faculdade particular do oeste do Paraná [TCC]. Cascavel: FAG - Faculdade Assis Gurgacz; 2007.
19. Ordóñez PJA, Rodrigues MIC, Alvarez LF, Sanz MLG, Minguillón GDGF, Perales LLH, et al. Tecnologia de alimentos. Alimentos de origem animal. Fátima Murad, tradutor. Porto Alegre: Artmed; 2005. v.2.
20. Prata LF, Ribeiro AC, Rezende KT, Carvalho MRB, Ribeiro DAS, Costa RG. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (Saanen). Cienc Tecnol Aliment. 1998;18:428-32.
21. Assenat L. Leche de oveja. Zaragoza: Acribia; 1991.
22. Boyazoglu J, Morand FP. Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality: a critical review. Small Rumin Res. 2001;40:1-11.
23. Nespolo CR, Taffarel JAS, Brandelli A. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos durante a produção e maturação do queijo Fascal. Acta Sci Vet. 2009;37:323-8.
24. Alichanidis E, Polychroniadou A. Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. Brussels: International Dairy Federation Publications; 1996.
25. Haenlein GFW. Past, present and future perspectives on small ruminant dairy research. J Dairy Sci. 2001;84:2097-115.
26. Teixeira E, Meinert EM, Barbetta PA. Análise sensorial de alimentos. Florianópolis: UFSC; 1987.

**Recebido em: 01/06/12**

**Aceito em: 04/02/13**

## Comitê de Avaliadores

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

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

## REVISTA “VETERINÁRIA E ZOOTECNIA”

## NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

## ARTIGOS CIENTÍFICOS

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

## 1. Página de rosto, com:

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

## 2. Página com resumo, abstract e resumen

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

## 3. A estrutura do artigo deverá conter:

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

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

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

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

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

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

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

## ARTIGOS DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

## RELATOS DE CASO

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

## COMUNICAÇÕES CURTAS

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

## REFERÊNCIAS E CITAÇÕES

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

### Exemplos

#### *Citações*

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

#### *Referências*

Indique até seis autores seguidos de et al.

## 1 Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

## 2 Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

## 3 Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

## 4 Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

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

## 5 Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

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

## 6 Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos

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

## 7 Publicações disponíveis na Internet

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

## JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE AND ANIMAL SCIENCE

### RULES FOR PRESENTATION OF PAPERS

The **Journal of Veterinary Medicine and Animal Science**, from School of Veterinary Medicine and Animal Science - UNESP, Botucatu, publishes original scientific and review papers, case reports and short communications related to Veterinary Medicine and Animal Science with semestral periodicity. The journal is open to national and/or foreign contributions (in English or Spanish) under the author's full responsibility.

Publication is conditioned to preliminary evaluation by the president of the editorial board, that analyses the merit and formal aspects of the work, according to the category of submitted paper and established editorial rules. If adequate, the article is subjected to review by two experts in the field. Opinion of reviewers are kept undisclosed. There are no possibility of identification of authors and reviewers. The articles not accepted will be returned to the authors.

Manuscripts must be submitted at the journal website <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>.

**Prof. Helio Langoni**

**Revista "Veterinária e Zootecnia"**

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

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

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

#### SCIENTIFIC PAPERS

Must be prepared according to the following items:

**1. Title page:**

- Title of the manuscript in Portuguese, English and Spanish, using Times New Roman font 12, simple spacing, bold and centered, with the words in upper case. When necessary, indicate the financial support as first footnote;

- Full authors names, where only the first letter of each name must be in upper case at the right side of the page. The authors' names must be typed separated by line, with numbered superscript **footnotes, which will indicate** the position and author's professional address, followed by the name of the institution where the work was done or to where it is linked;

- Name, address, telephone number, fax and e-mail address for correspondence;

- In case of involvement of human or experimental animals include the Ethics Committee approval or equivalent, and type before the bibliographic references with date of approval.

**2. Abstract in Portuguese, English, and Spanish**

- The "resumo", abstract and "resumen" must be followed by the title in the respective language and should not exceed 400 words each, with information regarding introduction, methods, results and conclusions. Text must be justified and in a single paragraph, simple spacing, beginning with the "RESUMO". Independent of the paper language, the abstract must be submitted in English, Portuguese and Spanish.

- Must include a maximum of five "palavras-chave", keywords, and palabras claves that identify the text content.

**3. The structure of the paper must include:**

**Introduction:** Clearly state the objective of the study with brief overview of the investigated problem and literature review.

**Material and Methods:** Provide a concise description of the experimental methods, variables, population in study, equipment, as well as the statistics, in sufficient detail to allow other researches to reproduce the results.

**Results:** The results should be described without interpretation and comparisons. The results may include **tables**, which should come in a separate sheet (maximum of 5 tables) and numbered consecutively in Arabic numerals, with the title on the top, according to the rules of table presentation by ABNT/WBR 6023/2000 from Associação Brasileira de Normas Técnicas, and identified in the text as Table; **figures**, in case of graphs, photographs, drawings, maps, etc, numbered consecutively in Arabic numerals (maximum of six), cited in the text as Figure. **Photographs** may be black and white or color, identified with the author's name in the back. **Original drawings** must be printed in high quality paper.

**Discussion:** Should be the interpretation of the results, relative to other relevant studies, presented in the introduction. If convenient, the results and discussion may be presented together.

**Conclusions:** The final synthesis, based on the results and discussion.

**References:** Should be presented according to Vancouver rules (<http://www.icmje.org/>), and arranged in alphabetical order, by author's last name (examples in the end of the instructions).

Manuscripts **should** be edited in Microsoft Word for Windows, for text, Excel (any version) for graphs, JPEG or GIF format (images) for photographs, drawings and maps, A4 format paper (21,0 x 29,7 cm), double spaced, leaving at least 2,5 cm margins, (lateral, top and bottom of page), Times New Roman font, size 12 and numbered in Arabic numerals, beginning in the identification page. The authors will have to present numeration in the lines, restarting the counting to each new page. Illustrations and legends must be presented on separate sheets.

Reprints will not be offered. The articles will be available in PDF format at the journal website. The same rules apply for all the other sections of the journal. The manuscripts should not exceed 15 pages. Unusual abbreviations should be used only after first time citation.

## REVIEW ARTICLES

The review articles will be published in Portuguese, English or Spanish, if it provides scientific contribution that is relevant in the area, when invited by the editors. The review articles must include: Title (Portuguese, English and Spanish), resumo with palavras-chave, abstract with key words and resumen with palabras-claves, introduction, subject overview, conclusion e references. Must contain a maximum of 20 pages and 60 references.

## CASE REPORTS

Should not be prepared with the same structure as the articles. The case reports must present the title in Portuguese, English and Spanish, resumo with palavras-chave, abstract with keywords and resumen with palabras claves and references. Must contain a maximum of five pages, three tables or figures and 15 references.

## SHORT COMMUNICATIONS

These are reports with new and relevant data of original studies, as preliminary results of a research. Must be presented with a maximum of five pages, one table and ten references. The structure should follow the same rules for case reports.

## REFERENCES AND CITATIONS

References should be numbered consecutively in order in which they are first mentioned in the text, tables, and legends by Arabic numbers in parentheses in same sequence. The titles of journals should be abbreviated according to the style *List of Journals Indexed in Index Medicus* available from: <http://www.nlm.nih.gov>.

### Examples:

#### *Citations*

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram. O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51). O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

### References

List the first six authors followed by et al.

#### 1 Journal article

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

#### 2 Organization as author

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

#### 3 Book

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

#### 4 Chapter in a book

Corrêa MC, Corrêa CNM. 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 pie de página;
- Nombres completos de los autores, en los cuales solamente la primera letra de cada nombre debe ser mayúscula, en lado derecho de la página. Digitalarlos separados un por línea, con **notas de 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<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

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

**5 Ponencias o conferencias en simposio, congreso, reuniones, etc .**

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

**6 Tesis**

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

**7 Medios electrónicos en Internet**

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