

# **Veterinária e Zootecnia**

**Vet e Zootec.**

**2012 dezembro; 19(4): 428-622**

**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  
18618-000 – 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  
18618-000 – Dist. Rubião Júnior – Botucatu – SP - Brasil

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

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

Trimestral

Texto em português/inglês/espanhol

Descrição baseada em: v.18, n.4, dez. (2011)

ISSN Impresso 0102 -5716

ISSN Eletrônico 2178-3764

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

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 em Ciências; Cambridge Scientific  
Abstracts; Biosis; CAB Abstracts.**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Administração Geral da UNESP**

**Reitor Afastado**

Prof. Dr. Herman Jacobus Cornelis Voorwald

**Vice-Reitor no Exercício da Reitoria**

Prof. Dr. Julio Cezar Durigan

**Pró-Reitor de Pesquisa**

Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

**Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Profa. Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge

**Pró-Reitor de Graduação**

Profa. Dra. Sheila Zambello de Pinho

**Pró-Reitor de Extensão Universitária**

Profa. Dra. Maria Amélia Máximo de Araújo

**Pró-Reitor de Administração**

Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**Administração da FMVZ**

**Diretor**

Prof. Dr. Luiz Carlos Vulcano

**Vice-Diretor**

Prof. Ass. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

**Botucatu**  
**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
**FMVZ**  
**2012**

## 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, Gustavo Puglia Machado, Gabriele Gimenes Pereira e Maria Paula Toldo Tavares

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

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

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

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

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

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

**Prof. Dr. Helio Langoni**

**Revista “Veterinária e Zootecnia”**

**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu  
18618-000 - 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 .....436

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

**ANESTESIA EM CÃES COM DEGENERAÇÃO DE VALVA MITRAL - REVISÃO DE LITERATURA. / ANESTHESIA IN DOGS WITH DEGENERATIVE MITRAL VALVE – REVIEW. / ANESTESIA EN PERROS CON DEGENERACIÓN DE LA VÁLVULA MITRAL – REVISIÓN DE LITERATURA.** Laise Dórea Fernandes Vasconcelos, Rosana Maria de Oliveira Clark.....437

**AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA CAVIDADE CELOMÁTICA DE SERPENTES. / ULTRASONOGRAPHIC EVALUATION OF SNAKES COELOMIC CAVITY. / EVALUACIÓN ECOGRAFICA DE LA CAVIDAD CELÓMICA DE SERPIENTES.** Priscilla Mitie Matayoshi, Priscilla Macedo de Souza, Rui Seabra Ferreira Júnior, Nereu Carlos Prestes, Roberta Valeriano dos Santos.....448

**TRANSFERÊNCIA DE OÓCITOS EM ÉGUAS. / OOCYTE TRANSFER IN MARES. / TRANSFERENCIA DE OVOCITOS EN YEGUAS.** Bruna Marcele Martins de Oliveira, Carina de Fátima Guimarães, Juliana Nascimento Bittar, Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Claudia Barbosa Fernandes.....460

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO: ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES. / IN VITRO EMBRYO PRODUCTION: OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANTS. / PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO: EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LOS ANTIOXIDANTES.** Letícia Ferrari Crocomo, Wolff Camargo Marques Filho, Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga, Sony Dimas Bicudo .....470

**MATRIZ METALOPROTEINASES NA REPARAÇÃO CORNEAL. REVISÃO DE LITERATURA. / MATRIX METALLOPROTEINASES IN CORNEAL REPAIR. REVIEW. / METALOPROTEINASAS DE MATRIZ EN LA REPARACIÓN DE LA CORNEA. REVISIÓN DE LITERATURA.** Cintia Sesso Perches, Cláudia Valéria Seullner Brandão, José Joaquim Tilton Ranzani, Noeme Sousa Rocha, Maria Guadalupe Sereno, Joice Furtado Fonzar .....480

**A PRODUÇÃO DE LEITE ORGÂNICO E ASPECTOS DE SEGURANÇA ALIMENTAR. / THE PRODUCTION OF ORGANIC MILK AND FOOD SECURITY ASPECTS. / LA PRODUCCIÓN DE LECHE ORGÁNICA Y ASPECTOS DE SEGURIDAD ALIMENTICIA.** Mariana Cassins Galdino, Paulo Francisco Domingues, Bruna Sanches Lapenna.....490

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

**AUTOHEMOTHERAPY AT ACUPUNCTURE POINTS POST ORCHIECTOMY SURGERY IN CART HORSES- EIGHT CASES REPORT. / AUTO-HEMOTERAPIA EM PONTOS DE ACUPUNTURA NOS PÓS-OPERATÓRIOS DE ORQUIECTOMIAS DE EQUINOS CARROCEIROS- RELATO DE OITO CASOS. / AUTOHEMOTERAPIA EM PUNTOS DE ACUPUNTURA POST LA ORQUIECTOMÍA EN EQUINOS DE TRACCIÓN DE CARROZA- REPORTE DE OCHO CASOS.** Pierre Barnabé Escodro, Jean G. Fernandes Joaquim, Tobyas M. de Albuquerque Mariz, Aline Saraiva de Oliveira, Lucineia Oliveira Escodro, Elvan Nascimento Santos Filho, José Valmir Tenório Ferreira Junior, Juliana Oliveira Bernardo .....502

**CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM UM CÃO COM ALOPECIA POR DILUIÇÃO DE COR. / SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN A DOG WITH COLOR DILUTION ALOPECIA. / CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EN UN PERRO CON ALOPECÍA POR DILUCIÓN DEL COLOR.** Mariana Isa Poci Palumbo, Viciany Erique Fabris, Luiz Henrique de Araújo Machado.....507

## ARTIGOS/ARTICLES/ARTÍCULOS

- PREVALÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA E ASSOCIAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS COM A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE VACAS LEITEIRAS DA REGIÃO SUDOESTE DO PARANÁ. / PREVALENCE OF MASTITIS AND ASSOCIATION OF ETIOLOGIC AGENTS WITH SOMATIC CELL COUNT OF DAIRY COWS IN THE SOUTHWESTERN REGION OF PARANA. / PREVALENCIA DE LA MASTITIS Y ASOCIACIÓN DE LOS AGENTES ETIOLÓGICOS CON EL CONTEO DE CELULAS SOMÁTICAS DE VACAS LECHERAS DE LA REGIÓN SUROESTE DE PARANÁ.** Priscila Luiza Mello, Renata Olivotto Agostinis, Eliane Michalczuk Barzon, Rafael Barros Colombo, Aristeu Vieira da Silva, Lisiane de Almeida Martins.....513
- DIAGNÓSTICO DE SITUAÇÃO DAS PRÁTICAS DE MANEJO SANITÁRIO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE BOVINOS DE CORTE. / DIAGNOSIS OF SITUATION FOR PRACTICES IN HEALTH MANAGEMENT SYSTEMS FOR CATTLE PRODUCTION CUTTING. / DIAGNÓSTICO DE SITUACIÓN DE LAS PRÁCTICAS DE MANEJO SANITARIO EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE BOVINOS DE CARNE.** Fabrine Bigatão Pereira, Iveraldo dos Santos Dutra.....522
- AVALIAÇÃO DO EMPREGO DO PROTOCOLO OVSYNCH MODIFICADO NA TAXA DE PREENHEZ E MORTALIDADE FETAL EM *BUBALUS BUBALIS*. / AVALIATION OF EMPLOYING THE MODIFIED OVSYNCH PROTOCOL ON PREGNANCY RATE AND FETAL MORTALITY IN *BUBALUS BUBALIS*. / EVALUACIÓN DEL USO DEL PROTOCOLO OVSYNCH MODIFICADO EN EL ÍNDICE DE CONCEPCIÓN Y LA MORTALIDAD FETAL EM *BUBALUS BUBALIS*.** Romildo Romualdo Weiss, Fernando Pansera Dalla Costa, Luciana Ferri Frares, Luiz Ernandes Kozicki, Priscilla R Muradás, Renata A Abreu.....531
- MARCADORES INTERNOS COMO ALTERNATIVA AO ÓXIDO DE CRÔMIO-III NA DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE APARENTE EM TILÁPIA DO NILO. / INTERNAL MARKERS AS ALTERNATIVE TO CHROMIUM-III OXIDE TO DETERMINE APPARENT DIGESTIBILITY IN NILE TILAPIA. / MARCADORES INTERNOS COMO ALTERNATIVA AL ÓXIDO DE CROMO-III EN LA DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD APARENTE EN TILAPIA DEL NILO.** Renan de Mattos Botelho, Rafael Lopes da Silva, Mariucha Karina Honório Ribeiro Rocha, Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho, Flávia Mota Damasceno, Hinglidj de Carvalho Muller, Heraldo César Gonçalves, Luiz Edivaldo Pezzato .....539
- INFLUENCE OF LINEAGE OF OOCYTE DONOR ON THE YIELD AND MORPHOLOGY OF OOCYTES RECOVERED BY ULTRASOUND-GUIDED FOLLICULAR ASPIRATION IN NELLORE COWS/ INFLUÊNCIA DA LINHAGEM DA DOADORA DE OÓCITO SOBRE A PRODUÇÃO E MORFOLOGIA DE OÓCITOS OBTIDOS PELA ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSOM EM VACAS NELORE. / INFLUENCIA DEL LINAJE DE LA DONADORA DE OVOCITO SOBRE LA PRODUCCIÓN Y MORFOLOGÍA DE LOS OVOCITOS OBTENIDOS A TRAVÉS DE ASPIRACIÓN FOLICULAR GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA EN VACAS NELORE.** Renata Sanches Calegari, Diego Gouvêa de Souza, Daniela Martins Paschoal, Mateus José Sudano, Alicia Martins Júnior .....548
- EFFICACY OF FINE NEEDLE ASPIRATION IN THE DIAGNOSIS OF SPONTANEOUS MAMMARY TUMORS. / EFICÁCIA DA CITOLOGIA ASPIRATIVA NO DIAGNÓSTICO DE TUMORES MAMÁRIOS ESPÔNTANEOS. / LA EFICACIA DE LA ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA EN EL DIAGNÓSTICO DE TUMORES MAMARIOS ESPONTÁNEOS.** Marcia Moleta Colodel, Isabelle Ferreira, Fernanda Carmelo Figueiroa, Noeme Sousa Rocha .....557
- SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS EM PASTAGENS DE CAPIM XARAÉS NOS PERÍODOS DE SECA E TRANSIÇÃO SECA-ÁGUAS. / SUPPLEMENTATION FOR DAIRY CATTLE IN XARAÉS GRASS PASTURE IN DROUGHT AND DRY-WATER TRANSITION SEASONS. / SUPLEMENTACIÓN DE VACAS LECHERAS MANTENIDAS EN PASTO INSURGENTE DURANTE LOS PERÍODOS DE ESTIAJE Y TRANSICIÓN SEQUÍA-LLUVIA.** Daniel Marino Guedes de Carvalho, Luciano da Silva Cabral, Janaina Januario da Silva, Thiago Luiz Queiros Arnoldo, Ricardo Alessandro Baez, Renato Esteves Sandri.....564

- GANHO DE PESO E MEDIDAS BIOMÉTRICAS DE CAPRINOS JOVENS EM FUNÇÃO DO GRUPO RACIAL, PESO DE ABATE E SEXO. / WEIGHT AVERAGE DAILY GAINS AND BIOMETRIC MEASURES IN KIDS AS AFFECTED BY GENOTYPE, SLAUGHTER WEIGHT AND SEX / GANANCIA DE PESO Y MEDIDAS BIOMÉTRICAS DE CABRITOS EN RELACIÓN CON EL GENOTIPO, PESO AL SACRIFICIO Y SEXO.** Jakilane Jacque Leal de Menezes, Heraldo Cesar Gonçalves, Gil Ignácio Lara Cañizares, Luciana Rodrigues, Brenda Batista Lemos de Medeiros, Helen Fernanda Barros Gomes, Raquel Ornelas Marques, Melissa de Souza Emerson .....574
- CARACTERÍSTICAS DOS ADOTANTES DE CÃES NA ÁREA URBANA DE BOTUCATU. / CHARACTERISTICS OF DOG ADOPTERS IN THE URBAN AREA OF BOTUCATU. / CARACTERÍSTICAS DE LAS PERSONAS QUE ADOPTAN PERROS EN LA REGIÓN URBANA DE BOTUCATU.** Igor Adolfo Dexheimer Paploski, Selene Daniela Babboni, Gabriella Koppány González, Rosângela Maria Giarola, Sérgio Augusto Rodrigues, Ana Teresa de Abreu Ramos Cerqueira, Carlos Roberto Padovani, Cassiano Victória, José Rafael Modolo .....584
- PERFIL DE AGLUTININAS ANTI-LEPTOSPIRA E ANTI-BRUCELLA E CONDIÇÕES SANITÁRIAS DE OVINOS DA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL./ PROFILE OF AGGLUTININS ANTI-BRUCELLA AND ANTI-LEPTOSPIRA AND HEALTH CONDITIONS OF SHEEP FROM NORTHWEST REGION OF THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL. / PERFIL DE AGLUTININAS ANTIBRUCELLA Y ANTILEPTOSPIRA Y CONDICIONES SANITARIAS DE OVINOS DE LA REGIÓN NOROESTE DEL ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.** Márcia Marinho, Luiz Cláudio Nogueira Mendes, Carlos Noriyuki Kaneto, Cilene Vidovix Taparo, João Otávio Rodrigues Bernardes, Adriana Longo Lombardi, Silvia Helena Venturoli Perri, Adonis Benvenuto Baldasso, Matheus Marussi Ribeiro .....593
- PERFIL DE SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE CÃES FRENTE A ANTIMICROBIANOS. / SENSITIVITY PROFILE OF PATHOGENIC ISOLATED BACTERIA FROM DOGS FACING ANTIMICROBIAL. / PERFIL DE LA SENSIBILIDAD DE BACTERIAS PATÓGENAS AISLADAS DE PERROS FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS.** Adriana Resmond Cruz, Antonio Carlos Paes, Amanda Keller Siqueira .....601

## EDITORIAL

## CIÊNCIA E DOCÊNCIA

Ao iniciar este editorial, refleti um pouco sobre que tema abordar, e olhando do lado sobre minha bancada de trabalho li em letras garrafais: “Parabéns, professores, pelo nosso dia!”, material impresso que a Associação dos Docentes da UNESP – ADUNESP enviou aos professores da universidade em comemoração ao dia do professor. Encontrei-me, pois uma revista científica só pode ser mantida porque há professores que são pesquisadores, além da arte de ensinar aos alunos. Homenagem justa neste documento foi feita a Paulo Freire, nobre educador, e que transcrevemos a seguir “Estar no mundo sem fazer história, sem por ela ser feito, sem fazer cultura, sem “tratar” sua própria presença no mundo, sem sonhar, sem cantar, sem musicar, sem pintar, sem cuidar da terra, das águas, sem usar as mãos, sem esculpir, sem filosofar, sem pontos de vista sobre o mundo, sem fazer ciência, ou teologia, sem assombro em face do mistério, sem aprender, sem ensinar, sem ideias de formação, sem politizar...não é possível.”

Não menos importante, neste documento há o pensamento de Cora Coralina “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”. Professores e pesquisadores novamente são homenageados, e concordando com ela, diria que este deve ser realmente o legado. Como a ciência é desenvolvida pelos professores e pesquisadores, este número da “Veterinária e Zootecnia” traz uma diversidade de artigos de revisão e de trabalhos originais, reforçando a importância da pesquisa no país e o papel relevante dos professores na transferência do conhecimento. São seis artigos de revisão: Anestesia em cães com degeneração de valva mitral - revisão de literatura; Avaliação ultrassonográfica da cavidade celomática de serpentes; Transferência de oócitos em éguas; Produção de embriões in vitro: estresse oxidativo e antioxidantes; Matriz metaloproteinases na reparação córnea; e A produção de leite orgânico e aspectos de segurança alimentar. Dois relatos de caso: Autohemotherapy at acupuncture points post orchietomy surgery in cart horses- eight cases report; e Carcinoma de células escamosas em um cão com alopecia por diluição de cor. E onze artigos originais: Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região Sudoeste do Paraná; Diagnóstico de situação das práticas de manejo sanitário em sistemas de produção de bovinos de corte; Avaliação do emprego do protocolo ovsynch modificado na taxa de prenhez e mortalidade fetal em *bubalus bubalis*; Marcadores internos como alternativa ao óxido de crômio-III na determinação da digestibilidade aparente em tilápia do Nilo; Influence of lineage of oocyte donor on the yield and morphology of oocytes recovered by ultrasound-guided follicular aspiration in nellore cows; Efficacy of fine needle aspiration in the diagnosis of spontaneous mammary tumors; Suplementação de vacas leiteiras em pastagens de capim xaraés nos períodos de seca e transição seca-águas; Ganho de peso e medidas biométricas de caprinos jovens em função do grupo racial, peso de abate e sexo; Características dos adotantes de cães na área urbana de Botucatu; Perfil de aglutininas anti-leptospira e anti-brucella e condições sanitárias de ovinos da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil; e Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos.

Ao encerrar o volume 19, queremos agradecer aos avaliadores que emitiram pareceres, contribuindo para o êxito da “Veterinária e Zootecnia”. É final de ano, motivos para comemorações e assim desejamos a todos Feliz Natal e Venturoso Ano Novo.

**Prof. Helio Langoni**  
Editor-Chefe

## ANESTESIA EM CÃES COM DEGENERAÇÃO DE VALVA MITRAL - REVISÃO DE LITERATURA

Laise Dórea Fernandes Vasconcelos<sup>1</sup>  
Rosana Maria de Oliveira Clark<sup>2</sup>

### RESUMO

Atualmente a incidência de cães portadores de degeneração de valva mitral é crescente. Observa-se, portanto, um aumento no número de procedimentos cirúrgicos nesses pacientes em clínicas e hospitais veterinários. Dessa forma, o conhecimento da fisiopatologia da doença, assim como a ação farmacológica dos anestésicos sobre o sistema cardiovascular é imprescindível. Destacam-se nesta revisão os fenotiazínicos, benzodiazepínicos e opióides como agentes pré-anestésicos ou de indução; o tiopental, propofol e etomidato como agentes de indução intravenosos e o halotano, isoflurano e sevoflurano como agentes voláteis seguros para cardiopatas.

**Palavras-chave:** procedimento anestésico, cardiopatas, alterações hemodinâmicas, canino.

### ANESTHESIA IN DOGS WITH DEGENERATIVE MITRAL VALVE – REVIEW

#### ABSTRACT

Currently the incidence of dogs with degenerative mitral valve is increasing. It's observed, so, an increase of surgical procedures due to the improvement of anesthetic technique and monitoring in these animals. Thus, the knowledge about the disorder's physiopathology, such as the anesthetic's pharmacological action on the cardiovascular system, are essential. In this review could be highlighted phenothiazines, benzodiazepines and opioids as pre-anesthetics or induction agents. The thiopental, propofol, and etomidate as intravenous induction agents and the halotane, isoflurane and sevoflurane as safe volatile agents for patients with cardiac disease.

**Keywords:** anesthetic procedure, cardiac, hemodynamic changes, canine.

### ANESTESIA EN PERROS CON DEGENERACIÓN DE LA VÁLVULA MITRAL – REVISIÓN DE LITERATURA

#### RESUMEN

En la actualidad la incidencia de perros con degeneración de la válvula mitral es cada vez más grande. Existe, por tanto, un número cada vez mayor de procedimientos quirúrgicos en estos pacientes en las clínicas y los hospitales veterinarios. Por lo anterior, se hacen esenciales el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, así como de la acción farmacológica de los anestésicos sobre el sistema cardiovascular. Se destacan en esta revisión las fenotiazinas, benzodiazepinas y opiáceos como agentes pre-anestésicos o de inducción. El tiopental,

---

<sup>1</sup> Graduanda do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. Rua Ramiro Nunes de Aquino, 21, Pontalzinho, Itabuna – BA, CEP: 45603105. Fone: (73) 3211-1414. dralaisevasconcelos@hotmail.com

<sup>2</sup> Professora Adjunta – Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Curso de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. Rod. Ilhéus – Itabuna, km16, Salobrinho, Ilhéus – BA, CEP: 45662-900. Fone/fax: (73) 3680-5406. rmoClark@uesc.br

etomidato y propofol como agentes de inducción intravenosa y el halotano, isoflurano y sevoflurano como agentes volátiles seguros para los pacientes con deficiencias cardíacas.

**Palabras clave:** anestesia, corazón, cambios hemodinámicos, canino

## INTRODUÇÃO

Atualmente, a incidência de cães portadores de cardiopatia atendidos em clínicas e hospitais veterinários é crescente e tem-se observado um aumento na casuística de procedimentos cirúrgicos realizados nestes animais devido ao aprimoramento de técnicas anestésicas adequadas, disponibilidade de aparelhos para monitoração e atuação de médicos veterinários especializados (1). A degeneração valvar mitral crônica ou degeneração mixomatosa de valva mitral é a cardiopatia mais comum em cães (2-4) e, embora a doença seja mais comumente diagnosticada em animais de pequeno porte, também pode ocorrer em cães de maior porte (5). Para tanto, a avaliação pré-operatória de animais que cursam com esta patologia cardiovascular deve incluir a escolha dos anestésicos de forma segura para o paciente, de acordo com o grau de degeneração da valva mitral e com os eventos fisiológicos provocados pela anestesia e sua ação farmacodinâmica (5, 6). O profissional que se propõe a anestesiá-los deve conhecer profundamente a fisiopatologia da doença com a qual está lidando e a técnica anestésica a ser empregada (6).

## REVISÃO DE LITERATURA

### Degeneração de valva mitral

A doença crônica da valva mitral frequentemente leva a uma insuficiência cardíaca e é uma causa freqüente de insuficiência cardíaca congestiva no cão idoso (3, 4, 7). Alguns autores têm sugerido que a doença pode aparecer por fatores genéticos, traumatismo torácico, endocardite bacteriana e prolapso valvar mitral (3, 4). Estima-se que seja responsável por 75% a 80% das cardiopatias, sendo a prevalência dependente da idade, acometendo de 1 a 5% dos cães jovens e por volta de 75% de cães idosos (1, 3-5, 8-10). A degeneração valvar mitral crônica (DVMC) aumenta quase que de forma linear conforme a idade, aproximadamente 10% dos cães com 6 anos de idade apresentam esta patologia, sendo que este índice se eleva para 60% quando a idade é aumentada para 12 anos (11). A DVMC atinge todas as raças, desde cães de pequeno porte a médio como Poodle, Dachshund, Cavalier King Charles Spaniel e Papillon (1, 3, 4, 7, 9).

A DVMC é uma doença cuja sintomatologia se apresenta de forma variável, sendo os sinais clínicos decorrentes da disfunção do complexo valvar mitral (1, 4). O progresso da doença pode levar anos, desde a detecção de sopro cardíaco suave até o estágio final. Geralmente os primeiros sinais clínicos de descompensação são discretos, mas podem agravar-se dentro de dias ou semanas sendo que estes sinais relacionam-se com a presença ou o grau de um ou mais dos seguintes eventos fisiopatológicos: a) pressão atrial esquerda e venosa pulmonar elevada, resultando em dificuldade respiratória e tosse devido ao edema pulmonar e à compressão do brônquio principal esquerdo; b) redução do fluxo de ejeção ventricular esquerdo ou direito, resultando em fraqueza e diminuição da força; c) insuficiência cardíaca direita, resultando em efusão pleural e ascite e d) edema pulmonar agudo e fulminante ou fibrilação ventricular que leva à morte súbita (9).

A DVMC discreta a moderada pode não estar associada a qualquer sinal de doença e os cães portadores não apresentam sinais clínicos durante a maior parte da vida, pode ser observada intolerância ao exercício, sendo a tosse a queixa mais comum (4, 9). Embora esses sinais não sejam específicos para cardiopatia ou insuficiência cardíaca, merecem avaliação

adicional (9). Nos quadros avançados, a tosse pode ser causada pela congestão e edema pulmonares ou, mais comumente, pela associação de ambos (4, 9, 12). Outras queixas comuns são a taquipnéia, dispnéia e ortopnéia e ruídos respiratórios, como sibilos e crepitações difusas (4, 9).

### Considerações pré-anestésicas

Durante o ato anestésico-cirúrgico, o sistema cardiovascular é submetido a múltiplas agressões decorrentes do trauma cirúrgico e aos efeitos diretos ou indiretos dos anestésicos utilizados. Alterações na respiração, temperatura e sistema nervoso autônomo são bem toleradas por um sistema cardiovascular íntegro, porém pacientes com doença cardiovascular podem sofrer descompensação, que se apresenta como isquemia miocárdica, congestão pulmonar e/ou disritmias (1).

A avaliação cuidadosa do paciente cardiopata é fator crucial para escolha da técnica anestésica (13, 14). Deve-se obter o histórico clínico do animal, com atenção particular para as enfermidades atuais e passadas, assim como as medicações, vitaminas e suplementos utilizados (14).

O exame físico deve ser realizado com devido cuidado (6,13-15) e os exames complementares incluem eletrocardiograma, radiografia de tórax, ecocardiograma e exames laboratoriais como hemograma completo, análises das funções renal e hepática e, quando possível, testes de coagulação (6, 8, 13-15). A dosagem de potássio é importante, uma vez que esses animais frequentemente tomam diuréticos não-poupadores de potássio (13). O eletrocardiograma e a radiografia são fundamentais para a avaliação da presença de isquemia, distúrbios da condução, avaliação da anatomia e do tamanho do coração e comprometimento da circulação pulmonar. A ecocardiografia precordial é empregada na avaliação das funções ventricular e valvular e na detecção de infarto, fatores estes preditivos de morbidade do paciente cardíaco (6, 8, 13, 14, 16).

O objetivo da avaliação pré-anestésica é conhecer a gravidade da doença, o grau de comprometimento da função cardíaca e de outros órgãos, sobretudo pulmões, fígado e rins, que podem ser afetados pela doença base e assim, estabelecer o risco cirúrgico e quais as chances de sobrevivência do paciente (13, 14).

O risco anestésico-cirúrgico do paciente pode ser avaliado por diferentes índices sendo que o principal é o ASA, estabelecido pelo *American Society of Anesthesiologists* (1, 8, 13). Embora com utilidade comprovada para determinar o risco anestésico, a classificação ASA é restrita como valor preditivo principalmente para pacientes com cardiopatia, portanto, para pacientes com disfunção miocárdica, costuma-se utilizar a classificação funcional da *New York Heart Association*, empregada para direcionar o tratamento em humanos (Tabela 1) (13).

Outro modo de classificação dos pacientes com degeneração de valva mitral que tem sido utilizada para humanos com insuficiência cardíaca foi proposta pelo ACVIM (*American College of Veterinary Internal Medicine*) para uso em cães, sendo estes classificados em quatro categorias distintas de acordo com sua situação clínica e com os fatores de risco para desenvolvimento da degeneração de valva mitral (Tabela 2) (5).

Outros índices foram propostos para avaliação do paciente cardiopata, levando em consideração diversos fatores relacionados à doença cardíaca, e ao comprometimento de outros órgãos e funções pela própria afecção cardíaca, por exemplo, a congestão pulmonar (13). A presença de outras doenças associadas que podem comprometer o estado do paciente também são consideradas (13, 15).

Para o anestesista, o conhecimento das cardiopatias é de fundamental importância na escolha dos agentes a serem empregados, assim como todos os fármacos coadjuvantes necessários durante todo procedimento, como drogas de manutenção da função contrátil,

vasoconstritores ou vasodilatadores, entre outros, e a escolha da melhor manutenção diante do quadro (13, 14).

Tabela 1. Dois métodos para avaliação do estado do paciente com doença cardíaca.

Categoria	ASA – American Society of Anesthesiologists	New York Heart Association
I.	Paciente Hígido.	Paciente com doença cardíaca, que não resulta em limitação para atividade física; exercício físico comum não causa fadiga, dispnéia ou palpitação.
II	Paciente com doença sistêmica leve.	Paciente com doença cardíaca que ocasiona pequena limitação ao exercício; no repouso, paciente assintomático; atividade física corriqueira ocasiona fadiga, dispnéia e palpitação.
III	Paciente com doença sistêmica grave.	
IV	Paciente com doença sistêmica grave, que é um constante risco de vida.	Paciente com doença cardíaca que resulta em importante limitação ao exercício; confortável no repouso; mínima atividade física ocasiona fadiga, dispnéia e palpitação.
V	Paciente moribundo sem chance de sobrevivência em 24 horas, com ou sem cirurgia.	-

Fonte: Fantoni e Cortopassi, 2002.

Tabela 2 - Sistema de classificação para cães com degeneração valvar mitral.

ITEM	Definição
Estágio A	Cães em risco de desenvolver a doença que não possuem defeitos cardíacos estruturais identificáveis (ex.: Cavalier King Charles spaniel, Dachshunds).
Estágio B1	Cães com degeneração valvar mitral que nunca apresentaram sinais clínicos e que não possuem evidências radiográficas ou ecocardiográficas de remodelamento cardíaco.
Estágio B2	Cães com degeneração valvar mitral que nunca apresentaram sinais clínicos, mas que apresentam evidências radiográficas ou ecocardiográficas de remodelamento cardíaco (ex.: aumento do ventrículo esquerdo).
Estágio C	Cães com insuficiência valvar mitral e com histórico de sinais clínicos de doença cardíaca anteriores ou atuais associados com remodelamento cardíaco (cães apresentando insuficiência cardíaca pela primeira vez podem apresentar sinais clínicos graves e podem requerer internação).
Estágio D	Cães no estágio final da degeneração valvar mitral crônica e insuficiência cardíaca refratários ao tratamento (ex.: furosemida, espironolactona, pimobendan, Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina)

Fonte: Borgarelli e Haggstrom, 2010.

### Monitoração do paciente

No paciente cardiopata, a monitoração necessária para condução do ato cirúrgico pode diferir daquela empregada em um paciente hígido (1, 15). A monitoração invasiva da pressão arterial torna-se necessária em todos os pacientes instáveis, mesmo que o procedimento a ser realizado seja simples e que não haja perda substancial de sangue. Portanto, a escolha dos aparelhos de monitoração deve ser realizada de modo a levar em consideração o porte do

procedimento cirúrgico, se a cirurgia é para correção de cardiopatias e, sobretudo, o estado geral do paciente (13).

A monitoração adequada do paciente inclui os períodos pré, trans e pós-operatórios e são frequentemente avaliados os parâmetros: eletrocardiográficos, da pressão arterial (invasiva ou não invasiva), da oximetria de pulso, da capnografia, da temperatura retal, da pressão venosa central e, em cirurgias cardíacas ou de longa duração, dos gases anestésicos no ar inspirado, débito urinário, cateter de artéria pulmonar, temperatura orofaríngea e de ecocardiografia transesofágica (13, 16).

## **Terapia de suporte**

### **Oxigenação**

O oxigênio deve ser fornecido para qualquer paciente com cardiopatia. Os pacientes sedados devem receber oxigenação por meio de máscaras com fluxo não inferior a 5L/min., sendo assim, todos os pacientes intubados devem ser conectados ao aparelho de anestesia para que seja fornecido 100% de oxigênio, independente da administração ou não de agentes anestésicos voláteis (8). De acordo com Hughes (15), a administração de oxigênio durante três a cinco minutos antes da indução anestésica, terá um grande benefício, pois o fornecimento prévio de oxigênio preenche a capacidade residual pulmonar, que atua como um reservatório no caso de apnéia ou depressão respiratória durante a indução da anestesia.

### **Fluidoterapia**

A fluidoterapia deve ser realizada de maneira apropriada antes do procedimento anestésico, pois animais portadores de cardiopatias são intolerantes às alterações bruscas de volemia (1, 15). O fluido utilizado normalmente é o ringer com lactato, porém, dependendo do estado do animal, uma solução com teor reduzido de sódio torna-se mais adequado. A fluidoterapia deve ser continuada no pós-operatório até o animal estar se alimentando e bebendo água de forma voluntária (15).

## **Anestesia no paciente com degeneração de valva mitral**

O objetivo da anestesia do paciente com DVMC é a redução da fração regurgitante evitando, portanto, distensão ventricular, aumento da resistência vascular periférica, bradicardia, hipertensão venocapilar pulmonar e diminuição da contratilidade do miocárdio, medidas assim diminuem o refluxo sanguíneo para o átrio (1, 13). O objetivo da seleção de um fármaco para sedação e anestesia é minimizar as alterações cardiovasculares adicionais que este pode vir a ocasionar (1).

### **Fenotiazínicos**

Os tranqüilizantes fenotiazínicos são dentre os agentes pré-anestésicos, os mais rotineiramente utilizados na clínica de pequenos animais (1, 13). Destacam-se a acepromazina, a clorpromazina e a levomepromazina, sendo a primeira destas a mais utilizada em cães. Tais agentes podem ser empregados em pacientes portadores de cardiopatias, porém em doses baixas e naqueles assintomáticos (13). Os fenotiazínicos apresentam um efeito depressor sobre o sistema cardiovascular induzindo hipotensão, diminuição do débito cardíaco e da frequência cardíaca (1). A hipotensão é proveniente da ação bloqueadora em receptores alfa-1 adrenérgicos de forma dose-dependente, bem como da vasodilatação direta (13, 17). Stepien et al. (18), estudando os efeitos circulatórios da acepromazina em cães, observaram que esse fármaco reduz o débito cardíaco e o volume sistólico, sem alteração da frequência cardíaca. Além disso, distúrbios no ritmo podem ocorrer como diferentes graus de bloqueios atrioventricular e sinoatrial (13).

### **Benzodiazepínicos**

São amplamente utilizados em cães com cardiopatia por apresentarem mínimos efeitos sobre o sistema cardiovascular, não alterando o ritmo e a frequência cardíaca (1). O diazepam e o midazolam são os dois agentes mais empregados na medicina veterinária, como medicação pré-anestésica ou agentes indutores de anestesia (13). Mársico et al. (19), relataram em um estudo, que ao associarem o midazolam a diferentes concentrações de isoflurano, não foram observadas alterações do débito cardíaco devido à manutenção da pressão arterial média e da frequência cardíaca.

### **Analgésicos opióides**

Os opióides são muito utilizados na anestesia balanceada, pois promove analgesia intensa e diminuição na concentração de anestésicos voláteis e injetáveis na indução e manutenção da anestesia. Em geral, apresentam efeitos mínimos sobre o sistema cardiovascular, sendo essa característica benéfica, já que promove uma diminuição no consumo de oxigênio pelo miocárdio, diminuindo o risco de eventos isquêmicos (1, 13). Em doses elevadas podem provocar bradicardia e quando administrados pela via intravenosa, provocam liberação de histamina, ocasionando, deste modo, hipotensão (20). A morfina é o protótipo dos analgésicos opióides e é geralmente utilizada pela via intramuscular devido ao seu elevado potencial em liberar histamina quando administrada por via intravenosa, ocasionando assim hipotensão arterial (21).

A morfina, a meperidina e o tramadol não reduzem a frequência cardíaca e não deprimem a contratilidade do coração (13).

O fentanil é um opióide agonista de curta duração, sendo 75-100 vezes mais potente que a morfina. A administração por via intravenosa pode provocar bradicardia de forma dose-dependente devido ao aumento no tônus vagal, porém o fentanil produz mínimo efeito depressor do miocárdio e da vasculatura, tornando-o apropriado para vários tipos de cirurgia (22). Segundo Hughes e Nolan (23), quando administrado por via intravenosa na dose de 0.5mg/kg/min em cães de grande porte, complementando a anestesia com halotano, o fentanil conserva a função cardíaca e apresenta boas propriedades analgésicas, tornando a anestesia segura. Entretanto, em outro estudo em cães mestiços, concluíram que ao associar o fentanil ao halotano na dose de 0.4 – 0.8 mg/kg/min, o mesmo provoca redução da pressão arterial e da frequência cardíaca (22, 23).

### **Anestésicos gerais intravenosos**

Os anestésicos gerais são fármacos que deprimem o sistema nervoso central de forma dose-dependente e reversível, tendo como resultado a perda das capacidades de percepção de estímulos dolorosos e resposta a eles, mesmo não possuindo características analgésicas intrínsecas (1). Dentre os mais importantes e seguros para o uso em veterinária citam-se o tiopental, o propofol e o etomidato (1, 13).

O tiopental é um agente efetivo e econômico para a indução anestésica (24). Quando administrado de forma rápida por via intravenosa, causa uma queda transitória da pressão arterial devido à depressão do centro vasomotor (8, 25, 26). Este agente apresenta um efeito depressor do miocárdio e em algumas circunstâncias pode provocar arritmias ventriculares transitórias (8, 25). Entretanto, a sua utilização por via intravenosa de forma lenta não provoca hipotensão e pode resultar em um aumento brando da pressão arterial. A administração intravenosa lenta do tiopental pode minimizar os efeitos cardiovasculares, portanto pode ser utilizado efetivamente e com segurança em pacientes cardiopatas controlados ou assintomáticos, desde que em doses baixas e após a medicação pré-anestésica adequada (8, 25).

O propofol é frequentemente usado em induções anestésicas devido a suas características vantajosas em não proporcionar excitação nesta fase, quando sedativos ou tranquilizantes são utilizados na medicação pré-anestésica (1). Entretanto o propofol ocasiona efeito vasodilatador arterial direto que é, em parte, responsável pela redução brusca da pressão arterial durante a indução, resultante da redução na contratilidade do miocárdio e inibição simpática (27-29). Apresenta efeito inotrópico negativo e diminui a resistência vascular sistêmica de forma dose-dependente (30-32). O propofol não apresenta propriedades analgésicas, desse modo, a utilização de analgésicos como componentes para uma anestesia balanceada é justificada pela possibilidade de diminuição da dose, e conseqüentemente menor efeito sobre o sistema cardiovascular, e obtenção de melhor qualidade anestésica em relação ao seu uso isolado (31, 33).

A anestesia com etomidato é caracterizada por pouca ou nenhuma alteração cardiovascular ou respiratória, indução e recuperação anestésicas rápidas, por essa razão, seu uso é indicado na indução anestésica de pacientes com distúrbios cardiovasculares (14, 34). Apesar de ser indicado para pacientes com distúrbios cardíacos, o etomidato provoca diminuição na síntese de cortisol e sua administração por via intravenosa induz excitação, mioclonia, vômito, dor durante aplicação e apnéia durante a indução anestésica (30). Sendo assim, o uso concomitante de um miorrelaxante, como os benzodiazepínicos, é preconizado anteriormente a indução com etomidato (13).

### **Anestésicos Inalatórios**

Todos os agentes anestésicos inalatórios deprimem o desempenho cardiovascular de forma dose-dependente, ocasionando efeito inotrópico negativo, atividade simpática diminuída e vasodilatação. Dentre os anestésicos voláteis mais utilizados destacam-se halotano, isoflurano, sevoflurano (24).

O halotano é o agente que provoca maior depressão hemodinâmica, provocando também depressão cardiovascular e respiratória (20, 24, 35). Pode causar facilmente redução repentina da pressão arterial, diminuição da resistência periférica e inotropismo negativo tendo efeito direto sobre o miocárdio (35, 36). Este anestésico inalatório ainda reduz o automatismo cardíaco, causando atenuação da resposta cronotrópica à redução da pressão arterial sistólica (35). Seu uso deve ser evitado em pacientes com arritmias pré-existentes ou em condições onde a arritmia pode ocorrer durante o procedimento anestésico (20).

O isoflurano provoca queda da pressão arterial assim como o halotano, entretanto o débito cardíaco apresenta redução menor do que na utilização deste (20, 36). Essa manutenção do débito cardíaco está relacionada com a menor depressão da atividade barorreceptora pelo isoflurano, que altera a frequência cardíaca e os ritmos cardíacos, de forma compensatória, o que contribui com a manutenção do fluxo sanguíneo para os órgãos vitais, principalmente quando há variações hemodinâmicas importantes (6, 13, 35, 37). Uma das vantagens do uso do isoflurano é a não prevalência de arritmias cardíacas, por este agente não sensibilizar o miocárdio às catecolaminas endógenas, podendo ser utilizado com segurança em pacientes que estão recebendo adrenalina de forma exógena (6, 20, 35).

O sevoflurano é um anestésico volátil que promove uma melhor e mais controlada profundidade anestésica, além de indução e recuperação rápidas (38). Produz menor depressão do miocárdio, porém o efeito vasodilatador periférico é significativo (8, 35). Segundo Clark (26), em cães induzidos com máscara de sevoflurano foi observado sinais de taquicardia, a qual pode ser causada principalmente pela resposta barorreflexa induzida.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em cães com insuficiência mitral em grau leve e sem sintomatologia, os anestésicos de rotina podem ser utilizados, porém com atenção direcionada para os possíveis efeitos

cardiovasculares que eventualmente possam surgir. Os fenotiazínicos, o tiopental e o halotano são os que devem ser utilizados com mais cautela, em doses baixas e em cães assintomáticos, pois são os agentes que mais deprimem o sistema cardiovascular provocando hipotensão, distúrbios no ritmo e diminuição da contratilidade do miocárdio.

Quando a insuficiência mitral é avançada, o anestesiologista deve se atentar para manter o débito cardíaco assegurando que a frequência cardíaca esteja normal ou esteja levemente elevada. É importante que seja usada, em dose mínima, qualquer agente anestésico que provoque depressão inotrópica do miocárdio. A resistência vascular periférica deve ser reduzida para melhorar o fluxo e reduzir o grau de regurgitação da mitral, assegurando que o débito cardíaco seja mantido dentro da normalidade. A pressão venosa central deve ser preservada pela administração de fluidos e em casos onde complicações pulmonares são evidentes, a ventilação do paciente é válida.

Agentes anestésicos como o propofol e o isoflurano podem ser utilizados com cautela e em associação com analgésicos opióides, pois reduzem a dose necessária para indução anestésica, diminuindo assim o efeito hipotensor e atribuindo analgesia ao procedimento. A escolha por fármacos que exerçam efeitos mínimos sobre o sistema cardiovascular constituem a melhor escolha. Desse modo, opióides, benzodiazepínicos e o etomidato, o sevoflurano e o desflurano são os agentes que em associação adequada produzem mínimos efeitos no sistema cardiovascular, mantendo o débito cardíaco e exercendo menor depressão do miocárdio. Cabe, portanto, ao anestesiologista, escolher os agentes anestésicos e o suporte necessário de modo que os efeitos gerados no sistema cardiovascular estejam de acordo com o grau de insuficiência mitral e o estado do paciente.

## REFERÊNCIAS

1. Meneghetti TM, Oliva VNL. Anestesia em cães cardiopatas. *Medvop Rev Cient Med Vet Pequenos Anim Anim Estim.* 2010;8:194-9.
2. Borgarelli M, Zini E, D'Agno G, Tarducci A, Sanilli RA, Chiavegato D, et al. Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds. *J Vet Cardiol.* 2004;2:27-33.
3. Nazareth LAM. Insuficiência cardíaca congestiva em cães [dissertação]. Goiânia: Universidade Castelo Branco; 2006.
4. Muzzi RAL, Muzzi LAL, Araújo RB, Lázaro DA. Doença crônica da valva mitral em cães: avaliação clínica funcional e mensuração ecocardiográfica da valva mitral. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2009;61:337-44.
5. Borgarelli M, Haggstrom J. Canine degenerative myxomatous mitral valve disease: natural history, clinical presentation and therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2010;40: 651-63.
6. Auler Jr JOC. Anestesia para cardiopata para cirurgia não cardíaca. *Rev Bras Anesthesiol.* 1994;44:383-98.
7. Bedeford PGC. Anaesthesia for patients with cardiac disease. In: *Small animal anaesthesia, the increased-risk patient.* London: Baillière Tindal Limited; 1991. p.72-89.
8. Abbott JA. Doença valvular adquirida. In: Tilley LP, Goodwin JK. *Manual de cardiologia para cães e gatos.* 3ª ed. São Paulo: Roca; 2002. p.109-32.

9. Morais HA. Fisiopatologia da insuficiência cardíaca e avaliação clínica da função cardíaca. In: Ettinger SJ, Feldman EC. Tratado de medicina interna veterinária. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.732-53.
10. Haggstrom J, Pedersen HD, Kwart C. New insights into degenerative mitral valve disease in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004;34:1209-26.
11. Hamlin RL. Geriatric heart diseases in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2005;35:597-615.
12. Serfass P, Chetboul V, Sampedrano CC, Nicole A, Benalloul T, Laforge H, et al. Retrospective study of 942 small-sized dogs: prevalence of left apical systolic heart murmur and left-sized heart failure, critical effects of breed and sex. *J Vet Cardiol.* 2006;8:11-8.
13. Fantoni DT, Cortopassi SRG. Anestesia em cães e gatos. São Paulo: Roca; 2002.
14. Carpenter RE, Pettifer GR, Tranquilli WJ. Anesthesia for geriatric patients. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2005;35:571-80.
15. Hughes JML. Anaesthesia for the geriatric dog and cat. *Ir Vet J.* 2008;61:380-7.
16. Ferreira FS, Vale DF, Ramos RM, Carvalho CB. Eletrocardiograma na monitoração anestésico cirúrgica de cães. *J Bras Cienc Anim.* 2008;1:121-34.
17. Rezende ML, Farias A, Bolzan AA, Ferreira WL, Léga E, Nunes N. Levomepromazina e acepromazina no bloqueio da arritmia induzida pela adrenalina em cães anestesiados pelo halotano. *Cienc Rural.* 2002; 32:433-8.
18. Stepien RL, Bonagura JD, Bednarski RM, Muir WW III. Cardiorespiratory effects os acepromazine maleate and buprenorphine hydrochloride in clinical normal dogs. *Am J Vet Res.* 1995;56:78-84.
19. Mársico FF, Segura IAG, Tendillo FJC, Nascimento PRL, Paula AC, Frias A. Efeitos cardiorrespiratórios de acepromazina, xilazina e midazolam associados a diferentes concentrações de isoflurano. *Acta Sci.* 1998;20:355-60.
20. Flaherty D. Anaesthetic drugs. In: Welsh E. Anaesthesia for veterinary nurses. Malden: Blackwell Science; 2003. p.113-56.
21. Guedes GP, Rude EP, Rider MA. Evaluation of histamine release during constant rate infusion of morphine in dogs. *Vet Anaesth Analg.* 2006;33:28-35.
22. Andreoni V, Hughes JML. Propofol and fentanyl infusions in dogs of various breeds undergoing surgery. *Vet Anaesth Analg.* 2009;36:523-31.
23. Hughes JML, Nolan AM. Total intravenous anesthesia in Greyhounds: pharmacokinetics of Propofol and Fentanyl - a preliminary study. *Vet Surg.* 1999;28:513-24.
24. Cornich-Seahorn JL. Veterinary anesthesia. Woburn: Butterworth Heinemann; 2001.

25. Dugdale AHA, Pinchbeck GL, Jones RS, Adams WA. Comparison of two thiopental infusion rates for the induction of anaesthesia in dogs. *Vet Anaesth Analg*. 2005;32:360-6.
26. Clark RMO. Avaliação algimétrica e sinérgica em cães tratados pela levomepromazina, induzidos pelo tiopental e mantidos pelo sevoflurano, pré-tratados ou não pelo butorfanol [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2003.
27. Godet G, Watremez C, El Kettani C, Soriano C, Coriat P. A comparison of sevoflurane, target-controlled infusion propofol, and propofol/isoflurane anesthesia in patients undergoing carotid surgery: a quality of anesthesia and recovery profile. *Anesth Analg*. 2001;93:560-5.
28. Zheng D, Upton RN, Martinez AM. The contribution of the coronary concentrations of propofol to its cardiovascular effects in anesthetized sheep. *Anesth Analg*. 2003;96:1589-7.
29. Mair AR, Pawson P, Courcier E, Flaherty D. A comparison of the effects of two different doses of ketamine used for co-induction of anaesthesia with a target-controlled infusion of propofol in dogs. *Vet Anaesth Analg*. 2009;36:532-8.
30. Sams L, Braun C, Allman C, Hofmeister. A comparison of the effects of propofol and etomidate on the induction of anesthesia and on cardiopulmonary parameters in dogs. *Vet Anaesth Analg*. 2008;35:488-94.
31. Gasparini SS, Luna SPL, Cassu RN, Biasi F. Anestesia intravenosa total utilizando propofol ou propofol/cetamina em cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia. *Cienc Rural*. 2009;39:1438-44.
32. Ferro PC, Nunes N, Paula DP, Nishimori CT, Conceição EDV, Guerrero PNH, et al. Variáveis fisiológicas em cães submetidos à infusão contínua de diferentes doses de propofol. *Cienc Rural*. 2005;35:1103-8.
33. Warpechowski P, Santos ATL, Pereira PJI, Lima GG. Efeitos do propofol sobre o sistema de condução cardíaca. *Rev Bras Anesthesiol*. 2010;60:438-44.
34. Paula DP, Nunes N, Nishimori CTD, Lopes PCF, Cacareto R, Santos PSP. Efeitos da infusão contínua de propofol ou etomidato sobre variáveis intracranianas em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010;62:302-8.
35. Hall LW, Clarke KW, Trim CM. *Veterinary anaesthesia*. 10th ed. London: WB Saunders; 2001.
36. Palacios C, Benitez A. Anestesia inalatoria em pequenos animais. *Inf Vet*. 2005:16-20.
37. Massone F. *Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas*. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

38. Li H, Wang JK, Zeng YM, Yang CX, Chen HT, Wen J, et al. Sevoflurane post-conditioning protects against myocardial reperfusion injury by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2008;35:1043-51.

**Recebido em: 13/01/11**

**Aceito em: 22/05/12**

## AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA CAVIDADE CELOMÁTICA DE SERPENTES

Priscilla Mitie Matayoshi<sup>1</sup>  
Priscilla Macedo de Souza<sup>2</sup>  
Rui Seabra Ferreira Júnior<sup>3</sup>  
Nereu Carlos Prestes<sup>4</sup>  
Roberta Valeriano dos Santos<sup>1</sup>

### RESUMO

O interesse pelos répteis cresceu nos últimos anos e o aumento do número desses animais em cativeiro tornou necessário para o veterinário o conhecimento em manejo e clínica. Exames complementares como a ultrassonografia podem auxiliar no diagnóstico clínico de afecções nesses animais, que muitas vezes, não apresentam sinais clínicos evidentes. A ultrassonografia é um método diagnóstico seguro, não invasivo e eficiente utilizado na medicina de répteis. Suas aplicações incluem monitoramento da função reprodutiva e diagnóstico de afecções por meio da análise das mudanças anatômicas e topográficas dos órgãos. Existem poucos trabalhos sobre os aspectos ultrassonográficos dos diferentes órgãos de um grande número de espécies de animais selvagens, sendo raros aqueles realizados em serpentes. Estes répteis possuem o corpo e os órgãos internos alongados, o que os difere dos outros animais na sua forma e apresentação. Diante do exposto, esta revisão teve por objetivo descrever a técnica de exame, bem como os aspectos ultrassonográficos dos órgãos que compõem a cavidade celomática das serpentes.

**Palavras-chave:** ultrassonografia, cavidade celomática, serpentes.

### ULTRASONOGRAPHIC EVALUATION OF SNAKES COELOMIC CAVITY

#### ABSTRACT

Interest in reptiles has grown in the last years and the increasing of these animals in captivity became the knowledge in management and clinic, a necessity for the veterinarian. Complementary tests such as ultrasound may help in clinical diagnosis of diseases which often show no clinical evident signs. Ultrasound is a safe diagnostic method, non invasive and efficient in reptile medicine. The applications include monitoring of reproductive function and disease diagnostic through analysis of anatomical and topographical organs changes. There are few studies about ultrasound of different organs in a large number of wild animals and rare studies in snakes. These reptiles present the body and internal organs elongated, which differ them from others animals in form and presentation. The aim of this revision is to describe the technique of examination and the ultrasonographic aspects of the organs of coelomic cavity of snakes.

**Keywords:** ultrasonography, coelomic cavity, snakes.

<sup>1</sup> Pós-graduanda do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista(UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Professora do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista(UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Pesquisador do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista(UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

<sup>4</sup> Professor Adjunto do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista(UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

## EVALUACIÓN ULTRASONOGRÁFICA DE LA CAVIDAD CELÓMICA DE SERPIENTES

### RESUMEN

En los últimos años el interés por los reptiles ha crecido y el aumento del número de estos animales en cautividad hizo con que el conocimiento en el manejo y clínica sea una necesidad para el veterinario. Pruebas complementarias como el ultrasonido pueden ayudar en el diagnóstico clínico de las enfermedades en estos animales, que a menudo no muestran señales clínicas evidentes. La ultrasonografía es un método diagnóstico seguro, no invasivo y eficaz, utilizado en la medicina de reptiles. Sus aplicaciones incluyen el control de la función reproductiva y el diagnóstico de los trastornos de los órganos a través del análisis anatómico y topográfico. Existen pocos estudios sobre la apariencia ecográfica de los diferentes órganos de un gran número de especies de animales salvajes, siendo raros aquellos realizados en serpientes. Estos reptiles tienen el cuerpo y los órganos internos alargados, con lo cual les diferencian de otros animales en su forma y presentación. Teniendo en cuenta el anterior, esta revisión tiene el objetivo de describir la técnica de examen, y los aspectos ecográficos de los órganos que componen la cavidad celómica de las serpientes.

**Palabras clave:** ultrasonografía, cavidad celómica, serpientes.

### INTRODUÇÃO

A criação doméstica de répteis é uma prática relativamente recente, que cresce de maneira vertiginosa, e atualmente é considerado o terceiro segmento da indústria “pet” nos EUA e na Europa, perdendo apenas em popularidade para os cães e gatos. No Brasil, apesar de muito recente, esse mercado segue a tendência mundial e está crescendo rapidamente. Porém, esses animais exigem cuidados bastante distintos daqueles destinados aos demais animais domésticos, e por isso, é fundamental buscarmos conhecimentos adequados (1).

Geralmente estes animais não demonstram sinais clínicos evidentes na maioria das afecções e, freqüentemente, o exame físico não fornece informações suficientes para a conclusão do diagnóstico. As técnicas de diagnóstico por imagem como a ultrassonografia podem promover um diagnóstico mais preciso (2).

A ultrassonografia na medicina veterinária tem se mostrado um excelente método diagnóstico não invasivo (3). Ela é utilizada em diversas áreas incluindo: a oftalmologia, cardiologia, neurologia, ginecologia, andrologia, obstetrícia, oncologia e ortopedia (4). Além de auxiliar no diagnóstico de afecções por meio da análise das mudanças anatómicas e topográficas dos órgãos (5), em animais selvagens, esta técnica oferece novas oportunidades relacionadas com o manejo dos animais em cativeiro, principalmente na área reprodutiva, pois, em conjunto com outras técnicas de diagnóstico, pode promover uma melhora nos programas de reprodução de espécies ameaçadas (6).

O exame ultrassonográfico em répteis pode ser um desafio; a anatomia de muitas espécies é única e se difere consideravelmente quando comparada com mamíferos e aves (7). As serpentes possuem o corpo alongado e apresentam todos seus órgãos internos delgados e também alongados, o que os difere dos outros animais na sua forma e apresentação (8).

O sucesso do exame ultrassonográfico depende da habilidade e experiência do operador, incluindo o conhecimento da anatomia das espécies examinadas (7). O ultrassonografista deve estar familiarizado com a anatomia dos órgãos em estudo para reconhecer e diferenciar variações da normalidade de alterações causadas por doenças (6). Levando em consideração a importância desse método diagnóstico por imagem e o aumento da criação dessas espécies

selvagens em cativeiro, este trabalho teve por objetivo realizar uma revisão de literatura sobre a avaliação ultrassonográfica das estruturas da cavidade celomática de serpentes.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. ANATOMIA TOPOGRÁFICA

As serpentes não possuem diafragma separando o coração e pulmões dos órgãos abdominais, e suas estruturas estão distribuídas dentro de uma cavidade, denominada cavidade celomática (9). A cavidade celomática pode ser dividida em três partes: terço cranial, terço médio e terço caudal (10). O terço cranial geralmente é composto pela traquéia, esôfago, glândula paratireóide, timo, tireóide e coração (10). O terço médio é composto pelos pulmões, fígado, continuação do esôfago, estômago, baço, pâncreas, vesícula biliar e porção inicial do intestino delgado (10). A parte final do intestino delgado, gônadas, adrenais, rins e intestino grosso localizam-se no terço caudal (10). Essa divisão pode ser utilizada para facilitar a localização das áreas de interesse no diagnóstico por imagem ou na determinação do acesso cirúrgico (10).

Outro método utilizado para descrição topográfica das vísceras de serpentes é descrito por Thompson (11, 12), Brangdon (13), Gomes et al. (14) e Gabaldo et al. (15) que relaciona as vísceras das serpentes com a escutelação ventral com o objetivo de localizar a posição dos órgãos. A contagem é feita no sentido craniocaudal, sendo considerada a primeira escama cuja largura é maior que o comprimento e aquela que precede a placa anal, é considerada a última, como descrito por Gabaldo et al. (15). Posteriormente, esta técnica foi utilizada por Almeida et al. (16) para localização topográfica e ultrassonográfica dos órgãos internos de jararaca.

A organização das estruturas internas pode variar entre as famílias de serpentes (15-17). O coração das serpentes localiza-se no final do terço cranial da cavidade celomática (16, 18, 19), possui dois átrios divididos por um septo completo e um ventrículo com um canal interventricular (17). Embora exista essa comunicação entre os ventrículos, há uma separação consideravelmente funcional entre a circulação oxigenada e a não-oxigenada que deixa o ventrículo (17). A posição do coração varia de acordo com o nicho ecológico da serpente e de sua posição filogenética (9). Badeer (20) observou que em serpentes arborícolas, que estão sujeitas à pressão gravitacional sangüínea, o coração localiza-se mais cranial em relação à cabeça, enquanto que serpentes terrestres e serpentes aquáticas possuem o coração mais distante da cabeça.

Ao colocar a serpente em decúbito dorsal, os movimentos cardíacos podem ser visualizados pelos movimentos das escamas localizadas sobre o coração (10-19).

O fígado das serpentes localiza-se caudal ao coração e cranial ao segmento inicial do estômago (10). É bilobado (21), alongado e a vesícula biliar se encontra distante dele, em uma tríade, junto ao baço e ao pâncreas (10). Algumas espécies possuem o baço unido ao pâncreas, sendo chamado esplenopâncreas (9).

O estômago possui formato linear a alongado e localiza-se do lado esquerdo da cavidade celomática, imediatamente caudal ao segmento final do fígado (21). A superfície interna da sua parede é mais pregueada longitudinalmente do que a do esôfago (14).

O intestino divide-se em três porções: anterior, média e terminal. O intestino anterior estende-se até a altura da margem cranial do rim direito (14). É um tubo alongado, fortemente pregueado, formando uma sucessão de alças dispostas em "S" (14). O intestino médio é um tubo liso, bem estreito e quase reto, terminando entre os dois rins (14). O tubo digestivo se alonga, formando o intestino terminal que termina na cloaca (14).

As serpentes possuem dois ovários e dois ovidutos dispostos de forma assimétrica (22), do lado direito estão mais craniais do que do lado esquerdo (14) e estão situados entre a tríade pancreática e os rins (9). O crescimento folicular é influenciado pela sazonalidade (21).

O desenvolvimento folicular em répteis é dividido em fase pré-vitelogênica, onde os folículos apresentam-se pequenos e brancos e a fase vitelogênica, caracterizada por folículos grandes e amarelos por acúmulo de vitelo (21).

Os testículos são intra-abdominais, situados entre a tríade pancreática e os rins e aumentam de tamanho na estação reprodutiva (9). O testículo direito localiza-se mais cranial em relação ao esquerdo (19). Alguns autores descreveram a presença de epidídimo em serpentes (23, 24), porém no estudo realizado por DeNardo (25) esta estrutura não foi observada. Os ductos deferentes ligam os testículos às papilas genitais na cloaca (14). O tamanho dos testículos varia sazonalmente (21).

Os rins das serpentes localizam-se no terço caudal da cavidade celomática, possuem formato linear e são lobulados (26). O número de lóbulos varia de acordo com a espécie (26). Localizam-se em topografias diferentes na cavidade, sendo o direito mais cranial (26). O rim direito situa-se entre o final do intestino médio e terminal, e o esquerdo entre a porção cranial do intestino terminal e a cloaca (14). Serpentes não possuem vesícula urinária (26). Os machos possuem o segmento sexual renal na porção caudal dos rins, que aumentam durante a época reprodutiva (26) e tem o papel de secretar substâncias que são essenciais na ativação e sobrevivência dos espermatozoides durante a cópula (24).

## 2. TÉCNICA DE EXAME

Para a realização do exame ultrassonográfico em serpentes, utiliza-se um aparelho de alta resolução (27), equipado com transdutores lineares (28). Diferenças anatômicas entre as espécies e o tamanho do paciente, devem ser considerados para a escolha da técnica adequada (18). O conhecimento da anatomia determina o local onde o transdutor deverá ser acoplado (27) e a frequência do transdutor será escolhida de acordo com o tamanho do paciente (28). As frequências mais usadas em répteis, de acordo com Raiti (28), são de 5,0 e 7,5MHz, as quais penetram tecidos a uma profundidade de 10 e 5 cm, respectivamente. Redrobe e Wilkinson (19) recomendam a utilização de transdutores lineares de 7,5 a 10 MHz. O exame ultrassonográfico em serpentes com menos de cinco centímetros de diâmetro, necessita de almofada de recuo para aumentar a distância entre o transdutor e o animal, proporcionando uma melhor avaliação dos órgãos (28, 29). O mesmo efeito poderá ser obtido utilizando luvas de procedimento preenchidas por água colocadas entre o paciente e o transdutor (19).

O exame ultrassonográfico é um procedimento indolor e a escolha do método de contenção do animal levará em conta o tamanho do paciente, seu temperamento e sua mobilidade. Frequentemente, o exame ultrassonográfico em serpentes é realizado somente com contenção física, sem necessidade de sedação, com exceção de animais muito ativos ou agressivos (29). Alguns autores realizaram o exame ultrassonográfico em serpentes somente com a contenção física e obtiveram resultados satisfatórios (16, 30-34).

Os animais são posicionados em decúbito ventral ou esternal (17), e a janela acústica pode ser obtida pela parede lateral ou pela superfície ventral da cavidade celomática (28). Isaza, Ackerman e Jacobson (18) relataram que o acesso ultrassonográfico pela parede lateral da cavidade celomática resultou em uma pobre visualização das estruturas internas devido aos artefatos de imagem causados pelas costelas.

O gel acústico deve ser aplicado cinco minutos (28) ou até 30 minutos (29) antes do início do exame para penetrar entre as escamas, diminuindo a interface de ar (28, 29). A técnica de imersão em água pode ser utilizada em pacientes mais dóceis ou anestesiados (27). O animal fica parcialmente submerso em água morna com o transdutor posicionado sob a água a uma distância apropriada para a obtenção das imagens (19).

A varredura é feita no sentido craniocaudal (19). Todas as estruturas devem ser avaliadas em planos transversais e longitudinais para uma visualização tridimensional dos órgãos em estudo e para identificar possíveis alterações (19-28).

A principal limitação é a experiência do operador em realizar o exame e interpretar as imagens (29). A ecdise (mudança de pele) também pode dificultar a formação de imagem ultrassonográfica (28).

### 3. ANATOMIA ULTRASSONOGRÁFICA

#### 3.1 Coração

A ecocardiografia é uma ferramenta eficaz na avaliação dos movimentos das valvas cardíacas, cardiomegalias, identificação de trombos, massas intracardíacas, defeitos estruturais, doenças valvares e efusão pericárdica (35). De acordo com Stetter (29), a presença de discreta quantidade de líquido pericárdico é um achado normal em répteis.

Em serpentes, o coração geralmente localiza-se entre 20 a 33% da distância entre as narinas e a cloaca (29). Devido à mobilidade do coração das serpentes dentro da cavidade celomática, o ultrassonografista deve mover o transdutor alguns centímetros em direção cranial e caudal em relação à posição inicial durante o exame ecocardiográfico (36). Os planos ultrassonográficos são obtidos em eixo longo (plano longitudinal) e em eixo curto (plano transversal), movendo o transdutor da direita para a esquerda e em sentido cranial e caudal, respectivamente, para avaliar todas as estruturas cardíacas (37, 38). Os átrios são hipocogênicos e o miocárdio apresenta uma ecotextura homogênea, discretamente hiperecogênico em relação ao parênquima hepático (16).

A contratilidade cardíaca e a anatomia interna são significativamente diferentes em relação aos mamíferos (27). A contratilidade ventricular em répteis caracteriza-se por um movimento peristáltico quando comparado à contração concêntrica dos mamíferos (27). O miocárdio é espesso e irregular, dificultando a realização de medidas (27). Sem a identificação da espécie e valores normais da temperatura do ambiente, a mensuração da espessura das câmaras e alterações na contratilidade são questionáveis (35).

#### 3.2 Fígado

A ultrassonografia é eficaz na identificação de hepatopatias em serpentes (27). Os critérios adotados para o diagnóstico das doenças hepáticas focais ou difusas são similares aos usados em mamíferos (27). O fígado localiza-se imediatamente caudal ao ápice cardíaco e estende-se até a metade do comprimento total da serpente (28), ocupando grande parte do terço médio direito da cavidade celomática (39). Possui aspecto homogêneo e é envolvido por uma cápsula hiperecogênica (Figura 1) (28).

O fígado das serpentes possui uma veia hepática central evidente, o que ajuda a diferenciar do tecido gorduroso (29). Ao exame ultrassonográfico, esse vaso é caracterizado como uma estrutura tubular, de paredes ecogênicas e conteúdo anecogênico (28).

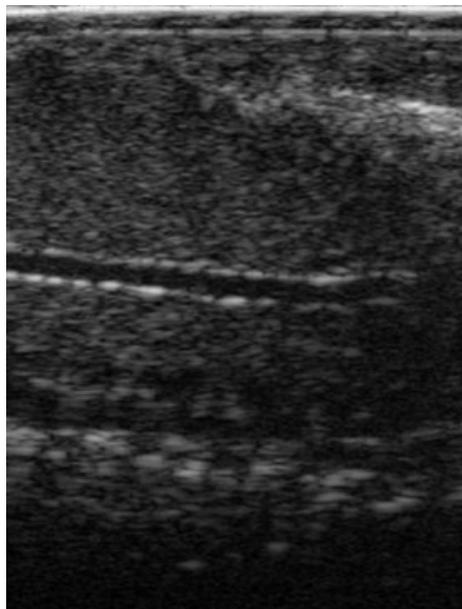


Figura 1. Imagem ultrassonográfica em plano longitudinal do fígado de cascavel (*Caudisona durissa terrifica*) **Fonte:** Priscilla Macedo de Souza

### 3.3 Vesícula Biliar

A vesícula biliar das serpentes não está em contato direto com o fígado (29). É caracterizada como uma estrutura anecogênica, envolvida por uma parede fina e ecogênica (Figura 2) (29). De acordo com Stetter (29) e Almeida et al. (16), a vesícula biliar é uma estrutura facilmente localizada na porção média do corpo da serpente, imediatamente caudal ao estômago, servindo de ponto de referência para a localização dos demais órgãos. Porém, no estudo realizado por Neto et al. (38), a vesícula biliar não foi identificada nos animais avaliados devido à presença de gás excessivo em alças intestinais adjacentes.

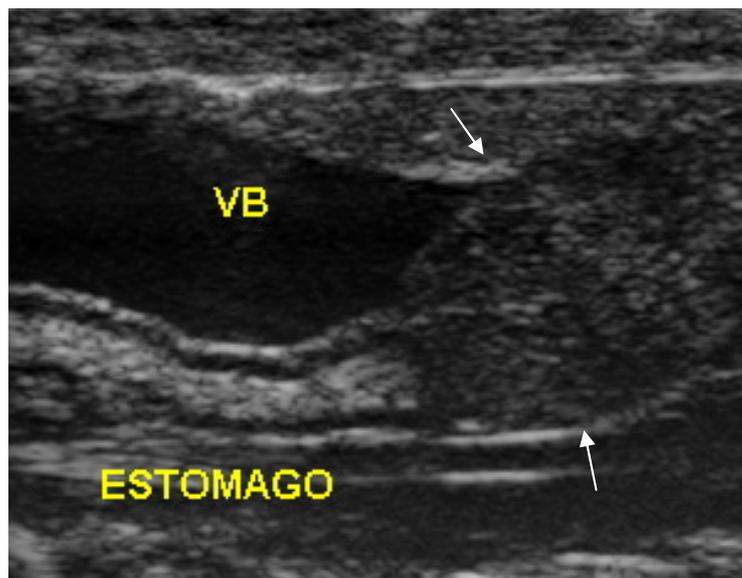


Figura 2. Imagem ultrassonográfica em plano longitudinal. Observa-se vesícula biliar (VB), estômago e esplenopâncreas (setas) de cascavel (*Caudisona durissa terrifica*).

**Fonte:** Priscilla Macedo de Souza - Setor de Diagnostico por Imagem (FMVZ/UNESP – Campus Botucatu).

### 3.4 Estômago e Alças intestinais

O estômago localiza-se dorsal ao fígado, as alças intestinais estão envolvidas por tecido gorduroso, o que dificulta a sua identificação, e o cólon está localizado próximo aos rins, no terço mediocaudal da cavidade celomática (28).

No estudo realizado por Isaza, Ackerman e Jacobson (18), o estômago foi facilmente identificado, porém, foram obtidas imagens ultrassonográficas de baixa qualidade devido à presença de gás luminal ou adjacente. Matayoshi et al. (33) visibilizaram parcialmente o estômago em alguns animais, e este foi identificado a partir do terço final do fígado, com paredes hipocogênicas. Raiti (28) e Redrobe e Wilkinson (19) relataram em seus trabalhos a dificuldade de visibilização ultrassonográfica das alças intestinais, devido à presença de gases, fezes ou conteúdo alimentar em seu lúmen.

### 3.5 Baço e Pâncreas

O baço e o pâncreas (esplenopâncreas) localizam-se imediatamente caudal à vesícula biliar e são dificilmente visibilizados (7-28). Ao exame ultrassonográfico, o baço caracteriza-se ultrassonograficamente como uma estrutura pequena e circular, discretamente hiperecogênica

em relação ao parênquima hepático (19). O pâncreas, quando visibilizado, apresenta-se hipocogênico em relação ao baço (16).

### 3.6 Rins

Os rins são dificilmente visibilizados em várias espécies de répteis (29). Nas serpentes, eles estão localizados a 75% do comprimento total da cavidade celomática, sendo o direito mais cranial em relação ao esquerdo (29). Os rins estão posicionados dorsolaterais ao cólon (38). Apresentam formato elipsóide, achatados no eixo dorsoventral, segmentados e envolvidos por uma cápsula fina e hiperecogênica (38). A região cortical é hiperecogênica em comparação à região medular (Figura 3) (38). Redrobe e Wilkinson (19) descreveram os rins com ecotextura semelhante ao fígado e ecogenicidade uniforme.

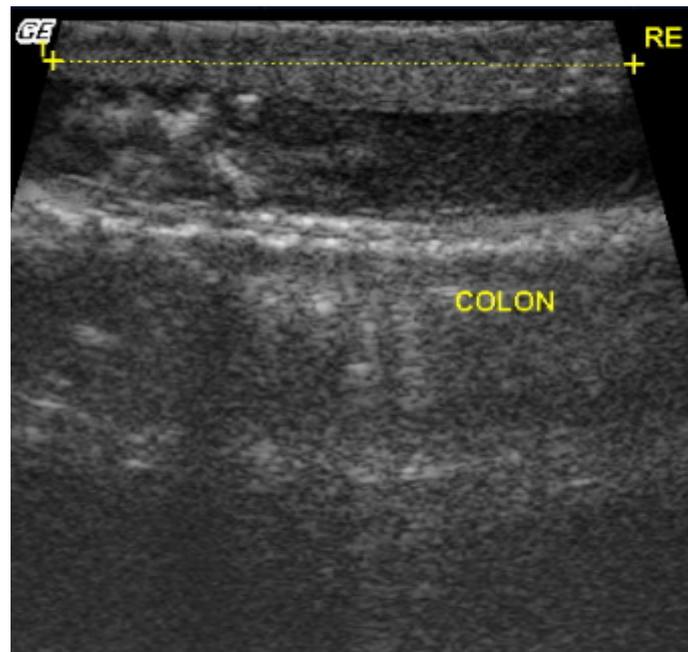


Figura 3. Imagem ultrassonográfica em plano longitudinal da porção terminal das alças intestinais (colon) de cascavel (*Caudisona durissa terrificica*). Observa-se rim esquerdo (RE) localizado dorsal ao intestino (entre os calipers).

**Fonte:** Priscilla Macedo de Souza

### 3.7 Testículos

O exame ultrassonográfico em machos é muito importante para avaliar as condições reprodutivas dos órgãos (6). Fornece informações sobre o tamanho e desenvolvimento dos testículos, sendo estes, em répteis, dificilmente observados ao exame ultrassonográfico quando inativos (6). Neto et al. (38) obtiveram pobre visibilização das estruturas reprodutivas de serpentes machos por influência da maturidade sexual dos animais em estudo. De acordo com Augusto (6), quando em atividade, o parênquima testicular é granular e de média ecogenicidade (Figura 4).

Os testículos estão localizados caudais à vesícula biliar; o direito mais cranial em relação ao esquerdo e apresentam formato fusiforme (28). Em serpentes maiores o ducto deferente é visibilizado como duas linhas paralelas hiperecogênicas ligadas ao testículo (19).

### 3.8 Ovários e ovidutos

A ultrassonografia ginecológica pode ser utilizada para a avaliação das condições reprodutivas, acompanhamento da foliculogênese, diagnóstico de gestação, previsão da data

de parturição, identificação das condições pré-natais (17), sexagem e identificação da viabilidade fetal em serpentes vivíparas (29). No estágio final da gestação, os fetos são identificados devido à presença do esqueleto hiperecogênico, batimentos cardíacos e movimentos fetais (Figura 5) (28). No exame ultrassonográfico de fêmeas fora do ciclo reprodutivo, os ovários são difíceis de serem visibilizados (19). Em período reprodutivo os ovários ocupam uma grande extensão da cavidade celomática (19). Os folículos aparecem como estruturas esféricas anecogênicas (pré-vitelogênicos) (Figura 6) ou hipoecogênicas (vitelogênicos) (19). Neto et al. (38) descreveram os folículos como estruturas ovóides, anecogênicas ou preenchidas por conteúdo parenquimal misto (anecogênico e hipoecogênico) devido ao acúmulo de vitelo, apresentando paredes finas, regulares e hiperecogênicas, com aspecto semelhante a um “colar de contas” envolvido por tecido gorduroso.

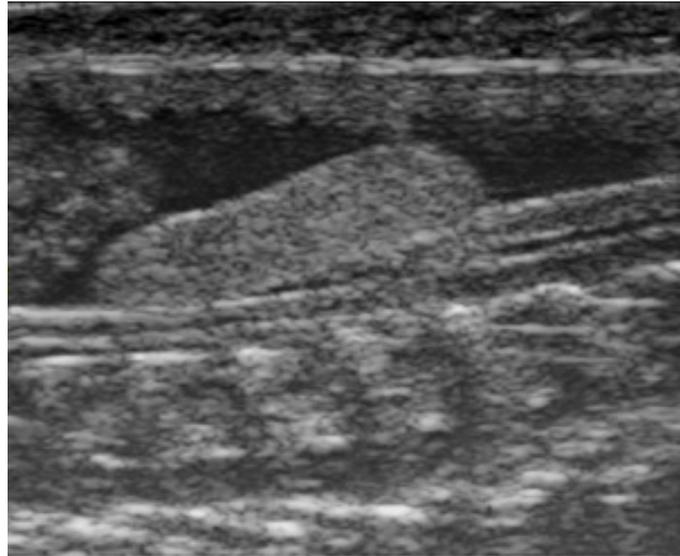


Figura 4. Imagem ultrassonográfica em plano longitudinal do testículo (seta) de cascavel (*Caudisona durissa terrifica*). **Fonte:** Priscilla Macedo de Souza



Figura 5. Imagem ultrassonográfica do feto de cascavel (*Caudisona durissa terrifica*) em fase final de gestação. Observa-se coluna vertebral hiperecogênica (seta).

**Fonte:** Priscilla Macedo de Souza

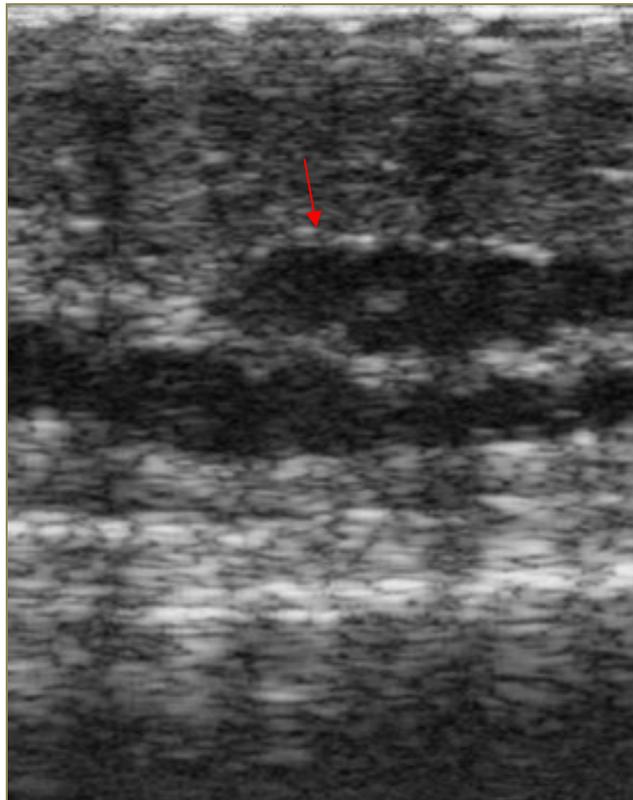


Figura 6. Imagem ultrassonográfica em plano longitudinal dos folículos pré-vitelogênicos de cascavel (*Caudisona durissa terrifica*) (seta). **Fonte:** Priscilla Macedo de Souza

Os ovidutos são visibilizados como paredes ecogênicas paralelas com centro hipoeecogênico (30). Em seu estudo com serpentes ovíparas, Smith et al. (40) relataram que os ovos foram caracterizados como estruturas ovais predominantemente hipoeecogênicas, com contornos hipereecogênicos. Foi observado o aumento progressivo da ecogenicidade da superfície dos ovos de acordo com a evolução da gestação (40).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ultrassonografia é uma técnica não invasiva, de baixo custo operacional, que auxilia no diagnóstico clínico de afecções por meio de alterações nos aspectos ultrassonográficos e anatômicos. É uma ferramenta importante no estudo da biologia reprodutiva dos répteis e pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias mais eficientes para a manutenção e reprodução de ofídios em cativeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Love K, Love B. Corn snakes - The comprehensive Owner's guide. California: AVS; 2005.
2. Valente ALS. Diagnostic imaging of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) [tese]. Barcelona: Universidade Autònoma de Barcelona; 2007.

3. Augusto AQ. Ultrasonography in South American wild animals. In: Fowler ME, Cubas ZS. Biology, medicine, and surgery of South American wild animals. Iowa: Iowa State University Press; 2001. p.536.
4. Hildebrandt TB, Goritz F. Use of ultrasonography in zoo animals. In: Fowler ME, Miller ER. Zoo & wild animal medicine. Current therapy. 4<sup>a</sup>ed. Philadelphia: Saunders; 1998. p.41-54.
5. Sainsbury AW, Gili C. Ultrasonography anatomy and scanning technique of the coelomic organs of the bosc monitor (*varanus exanthematicus*). J Zoo Wildl Med. 1991;22:421-33.
6. Augusto AQ. Ultra-sonografia. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens. São Paulo: Roca; 2007. p.879-95.
7. Schumacher J, Toal R. Advanced radiography and ultrasonography in reptiles. Semin Avian Exotic Pet Med. 2001;10:162-8.
8. Barraviera B, Ferreira Júnior RS. Acidentes por animais peçonhentos. Botucatu: CEVAP-UNESP; 2007.
9. Kolesnikovas CKM, Grego KF, Albuquerque LCR. Ordem squamata subordem Ophidia (Serpente). In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens. São Paulo: Roca; 2007. p.68-85.
10. Mithell MA. Snakes. In: Mitchell MA, Tully Junior TN. Manual of exotic pet practice. Missouri: Saunders; 2009. p.136-63.
11. Thompson JC. Contributions to the anatomy of the Ophidia. Proc Zool Soc Lond. 1913;2:414-25.
12. Thompson JC. Further contributions to the anatomy of the Ophidia. Proc Zool Soc Lond. 1914;1:379-402.
13. Bragdon DE. A contribution to the surgical anatomy of the water snake, *Natrix sipedon*; the location of the visceral endocrine organs with reference to ventral scutellation. Anat Rec. 1953;117:145-61.
14. Gomes N, Puerto G, Buobonato MA, Ribeiro MFM. Atlas anatômico de *Boa constrictor* Linnaeus, 1758 (Serpentes, Boidae). Monogr Inst Butantan. 1989;2:1-59.
15. Gabaldo FB, Gonzalez PO, Santos HF, Maso M. Topografia visceral comparadas de serpentes das famílias Viperidae e Colubridae com referência à escutelação ventral. In: Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 2008. Gramado. Gramado-RS: CONBRAVET; 2008. p.53.
16. Almeida FS, Conte AV, Sant'anna SS, Fernandes W, Grego KF. Localização topográfica e imagem ultrassonográfica dos órgãos internos da jararaca (*Bothrops jararaca*, Serpentes, Viperidae). In: Anais do 13º Congresso e 19º Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens; 2010, Campos do Jordão. Campos do Jordão-SP: ABRAVAS; 2010. p.67-70.

17. Jacobson EJ. Snakes. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1993;23:1179-213.
18. Isaza R, Ackerman N, Jacobson ER. Ultrasound imaging of the coelomic structures in the Boa constrictor (*Boa constrictor*). *Vet Radiol Ultrasound.* 1993;34:445-50.
19. Redrobe S, Wilkinson RJ. Reptile and amphibian anatomy and imaging. In: Redrobe S, Meredith A. *Manual of exotic pets.* 4ª ed. Barcelona: Grafos; 2002. p.193-207.
20. Badeer H. Anatomical position of heart in snakes with vertical orientation: a new hypothesis. *Comp Biochem Physiol.* 1998;119:403-5.
21. Jacobson ER. Overview of reptile biology, anatomy and histology. In: *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text.* Flórida: CRC Press; 2007. p.1-130.
22. Almeida Santos SM, Orsi AM. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. *Rev Bras Reprod Anim.* 2002;26:109-12.
23. Langlada FG, Ferreira ILL. Techniques of artificial insemination in *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae – Crotalinae). *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1994;31:141-4.
24. Saint-Girons H. Reproduction and growth. In: Bauchot R. *Snakes – a natural history.* New York: Sterling Publishing; 1994. p.92.
25. Denardo D. Reproductive biology. In: Mader DR. *Reptile medicine and surgery.* Philadelphia: W.B. Saunders; 2006. p.376-90.
26. Canny C. Gross anatomy and imaging of the avian and reptilian urinary system. *Semin Avian Exotic Pet Med.* 1998;7:72-80.
27. Silverman S. Diagnostic imaging. In: Mader DR. *Reptile medicine and surgery.* Philadelphia: W.B. Saunders; 2006. p.471-89.
28. Raiti P. Non-invasive imaging. In: Girling SJ, Raiti P. *Manual of reptiles.* British Small Animal Veterinary Association (BSAVA). 2ª ed. Cheltenham: Blackwell Publishing; 2004. p.87-102.
29. Stetter MD. Ultrasonography. In: Mader DR. *Reptile medicine and surgery.* Philadelphia: W.B. Saunders; 2006. p.665-74.
30. Chiaraviglio M, Sironi M, Cervantes R, Bertona M, Lucino S. Imagenes de ultrasonido de estruturas reproductivas em *Boa constrictor occidentalis* (serpentes: Boidae). *Gayana Zool.* 1998;62:91-5.
31. Betkowski SE. Estudo dos níveis de progesterona e estradiol séricos e acompanhamento das características ultra-sonográficas de ovários e ovidutos de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) mantidas em cativeiro, em um período de 12 meses [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2006.

32. Gnudi G, Volta A, Di Ianni F, Bonazzi M, Manfredi F, Bertoni G. Use of ultrasonography and contrast radiography for snake gender determination. *Vet Radiol Ultrasound*. 2009;50:309-11.
33. Matayoshi PM, Souza PM, Prestes NC, Ferreira Junior RS, Gasparotto VPO, Biscola NP. Avaliação ultrassonográfica hepática de cascavéis (*Caudisona durissa*). In: *Anais do 3º Herpétil*; 2010, Niterói. Niterói-RJ: INEA; 2010. p.10-1.
34. Matayoshi PM, Souza PM, Prestes NC, Ferreira Junior RS. Avaliação ultrassonográfica das estruturas da cavidade celomática da cascavel (*Caudisona durissa*). In: *Anais do 10º Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais*; 2010, São Paulo. São Paulo-SP: CONPAVEPA; 2010. p.17-9.
35. Murray MJ. Cardiology. In: Mader DR. *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2006. p.182-95.
36. Schilliger L, Tessier D, Pouchelon JL, Chetboul V. Proposed Standardization of the two-dimensional echocardiographic examination in snakes. *J Herpetol Med Surg*. 2006;16:90-102.
37. Snyder PS, Shaw NG, Hear DJ. Two-dimensional echocardiographic anatomy of the snake heart (*Python molurus bivittatus*). *Vet Radiol Ultrasound*. 1999;40:66-72.
38. Neto FPCP, Guerra PC, Costa FB, Araújo AVC, Minglino MA, Bombonato PP, et al. Ultra-sonografia do fígado, aparelho renal e reprodutivo da jibóia (*Boa constrictor*). *Pesqui Vet Bras*. 2009;29:317-21.
39. Jacobson ER, Homer B, Adams W. Endocarditis and congestive heart failure in a Burmese python (*Python molurus bivittatus*). *J Zoo Wildl Med*. 1991;22:245-8.
40. Smith CR, Cartee E, Hathcock JT, Speake DW. Radiographic and ultrasonographic scanning of gravid eastern indigo snakes. *J Herpetol*. 1989;23:426-9.

**Recebido em: 25/04/11**

**Aceito em: 25/07/12**

## TRANSFERÊNCIA DE OÓCITOS EM ÉGUAS

Bruna Marcelle Martins de Oliveira<sup>1</sup>  
Carina de Fátima Guimarães<sup>1</sup>  
Juliana Nascimento Bittar<sup>2</sup>  
Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1</sup>  
Claudia Barbosa Fernandes<sup>1</sup>

### RESUMO

Os progressos das biotécnicas da reprodução nos equinos são lentos quando comparados a outras espécies. Isso se deve primariamente ao grande número de particularidades anatomofuncionais inerentes à espécie e também à escassa disponibilidade de material para pesquisa. Produtos advindos de fêmeas de elevado padrão genético, por meio da conservação dos ovários, tornaram-se possíveis, determinando a continuidade do material genético em técnicas de Maturação *in vitro* (MIV) e Transferência de Oócitos (TO). As potenciais candidatas a doadoras de ovócitos são as fêmeas acometidas por afecções ovarianas, uterinas e cervicais, éguas que não apresentam bons resultados na Monta Natural (MN), Inseminação Artificial (IA) e/ou Transferência de Embriões (TE), sem causa definida, ou animais com anormalidades adquiridas durante a vida reprodutiva. Para a obtenção de oócitos em boas condições para transferência, alguns protocolos hormonais são utilizados com o objetivo de acelerar a maturação folicular e oocitária. Atualmente, a colheita dos oócitos é feita por meio de aspiração e lavagem dos folículos via transvaginal, guiada por ultrassonografia (TVA), no entanto, punções pelo flanco ou laparotomia com exposição dos ovários e aspiração dos folículos foram relatadas com sucesso. Os ovários de éguas abatidas em matadouro são as fontes mais abundantes de gametas, são excelentes modelos experimentais e material de treinamento. O sucesso da TO depende de vários fatores, um dos mais importantes tange a origem do oócito e a dificuldade de maturá-los *in vitro*, resultando em baixas taxas de desenvolvimento embrionário. Oócitos originários de folículos pré ovulatórios, maturados *in vivo*, apresentam taxas mais elevadas que as de oócitos maturados *in vitro*. A qualidade e o tipo de conservação do sêmen também interferem nos resultados, assim como a idade da doadora e da receptora determinam fator importante no sucesso da concepção por meio de TO. Assim, por se tratar de uma biotecnologia com grandes perspectivas e de uso ainda restrito, pela ausência de conhecimentos consolidados no assunto, o objetivo desta revisão é abordar os pontos relevantes para a compreensão e desenvolvimento da técnica de transferência de oócitos na espécie equina.

**Palavras-chave:** maturação *in vitro*, biotecnologia da reprodução, equinos, ovócitos.

### OOCYTE TRANSFER IN MARES

#### ABSTRACT

The progress of reproduction biotechnologies in horses are slow compared to other species. This is due to the large number of anatomical peculiarities inherent to the species and also by the limited availability of research material. Products from females of high genetic pattern, through the ovary conservation became possible, determining the continuity of genetic material through techniques like Oocytes in Vitro Maturation (IVM) and Oocyte Transfer

<sup>1</sup> Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - Cidade Universitária - São Paulo, SP CEP 05508-270. fernandescb@usp.br

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

(OT). Potential candidates to oocyte donors are older females and / or affected by ovarian, uterine, cervical disorders, and mares that have not had good results in Natural Mating (NM), Artificial Insemination (AI) and / or TE (Embryo Transfer) without apparent or acquired causes during their reproductive life. To obtain oocytes for transferring in good conditions, some hormonal protocols are used in order to accelerate follicular and oocyte maturations. Nowadays, collection of oocytes is made by aspiration and washing of the follicles guided by transvaginal ultrasound (TVA), however, punches through the flank or laparotomy with ovarian follicles exposure and aspiration have been reported with success. The ovarian oocytes from slaughterhouse are the most abundant gametes sources, excellent experimental models and training materials for valuable mares that may die. TO's success depends on several factors: one of the most important is related to the oocyte origin and in vitro maturation difficulty, resulting in embryonic development low rates. Oocytes from pre-ovulatory follicles, matured in vivo are higher than the ones matured in vitro. The quality and type of semen conservation also interfere in the results, as well as the donor and recipient age, determining success ful factor. Thus, it is a great prospects biotechnology with use still restricted because there are littler knowledge. The aim of this review is to address the relevant points for understanding and oocytes transfer technique development in mares.

**Keywords:** in vitro maturation, reproduction biotechnology, equine specie, oocytes

## TRANSFERENCIA DE OVOCITOS EN YEGUAS

### RESUMEN

Los avances en la biotecnología reproductiva de equinos son lentos en comparación con otras especies, esto se debe principalmente al gran número de particularidades anatomofuncionales inherentes a la especie y también a la escasa disponibilidad de material para investigación. La conservación de ovarios hizo posible la generación de productos procedentes de hembras de elevado potencial genético mediante el uso de técnicas de maduración in vitro (MIV) y transferencia de ovocitos (TO). Las hembras con potencial para ser donadoras de ovocitos son las hembras más viejas y/o afectadas por disturbios ováricos, uterinos o cervicales, así como yeguas que no presentan buenos resultados con monta natural, inseminación artificial o transferencia de embriones, sean estos resultados de origen idiopático o adquirido durante la vida reproductiva. Para obtener ovocitos en buenas condiciones para la transferencia, son utilizados algunos protocolos hormonales, con el objetivo de madurar el folículo y el ovocito. Actualmente la colecta de ovocitos es realizada por medio de aspiración y lavado de los folículos vía transvaginal guiada por ultrasonografía (TVA), sin embargo, las punciones por el flanco o laparotomía con exposición de los ovarios y aspiración de folículos han sido reportadas con éxito. Los ovarios de yeguas sacrificadas en mataderos son las fuentes más grandes de gametos, son excelentes modelos experimentales y material de entrenamiento para el aprovechamiento de los ovocitos de yeguas valiosas que van a morir. El éxito de la TO depende de varios factores, uno de los más importantes relacionado con el origen de los ovocitos y la dificultad de su maduración in vitro, lo que resulta en tasas bajas de desarrollo embrionario. La calidad y tipo de conservación del semen, así como la edad de la donadora y receptora son factores determinantes para el éxito de la concepción por medio de TO. El objetivo de esta revisión es abordar los puntos relevantes para la comprensión y desarrollo de la técnica de transferencia de ovocitos en yeguas.

**Palabras clave:** maduración in vitro, biotecnología de la reproducción.

## INTRODUÇÃO

A equinocultura é um setor crescente no Brasil, desempenhando papel importante como atividade na economia do país, por gerar cerca de 3,2 milhões de empregos diretos ou indiretos (1). Atualmente, o cavalo tem grande importância nos esportes como corrida, hipismo, pólo, provas funcionais, enduro equestre, entre outros, além de ser utilizado como ferramenta de lazer, trabalho e transporte. Com esse intuito, os criadores, cada vez mais, demonstram interesse na transferência da genética de animais com alto valor zootécnico, ou seja, existe a necessidade de que algumas características hereditárias sejam transmitidas aos descendentes, para que o melhoramento genético e consequente melhora no desempenho dos equinos sejam alcançados (2).

A implantação de biotécnicas da reprodução tem como principal objetivo melhorar os índices reprodutivos, favorecendo a produção de animais geneticamente superiores, maximizar a utilização reprodutiva de fêmeas e machos que apresentem características hereditárias desejáveis e permitir que animais portadores de alterações adquiridas não compatíveis com a reprodução natural, não interrompam a atividade (3).

Com isso, a geração de potros resultantes da reprodução assistida na espécie equina, é uma realidade atual. Produtos advindos de fêmeas, de elevado padrão genéticos, por meio da conservação dos ovários, tornaram-se possíveis, determinando a continuidade do material genético com as técnicas de Maturação *in vitro* (MIV) e Transferência de Oócitos (TO) (4, 5).

A TO trata-se de uma biotecnologia que auxilia no incremento dos índices reprodutivos, além de permitir a rápida multiplicação de linhagens genéticas, favorecer os estudos com relação à biologia, manipulação e maturação dos oócitos e aperfeiçoar técnicas básicas para tecnologias mais avançadas como a produção *in vitro* (PIV) de embriões e a clonagem (6).

A técnica de transferência de oócitos consiste na deposição do gameta feminino, advindo de uma égua doadora, já maturo (*in vivo* ou *in vitro*), no oviduto de uma receptora, a qual foi previamente inseminada. A fertilização e o desenvolvimento embrionário acontecem no trato reprodutivo da receptora de maneira natural, após a transferência artificial do gameta. A primeira TO que obteve sucesso foi realizada por McKinnon e colaboradores em 1988, contudo, apenas em 1993, Carnevale e Ginther obtiveram sucesso, com o nascimento do primeiro potro gerado por meio da técnica.

No que diz respeito ao local de deposição dos gametas, se o espermatozóide for depositado diretamente no oviduto, juntamente com o oócito, o procedimento é denominado transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) (7), que possibilita a utilização do número reduzido de espermatozóides, viabilizando a utilização de sêmen de qualidade inferior, sêmen congelado, sexado e de garanhões subfêrteis (4, 6).

A aplicação dessas técnicas exige investimento em equipamentos e treinamento de profissionais, sendo indispensável o conhecimento técnico com relação à morfologia, desenvolvimento e maturação dos oócitos, domínio da técnica de inseminação artificial e principalmente da técnica de transferência dos gametas (6).

Dessa forma, o objetivo desta revisão é abordar os pontos relevantes para a compreensão e desenvolvimento da técnica de transferência de oócitos em equinos.

### Fêmeas doadoras de oócitos

As potenciais candidatas a doadoras de ovócitos são as fêmeas acometidas por afecções ovarianas, uterinas, cervicais e éguas que não apresentam bons resultados na MN, IA e/ou TE sem causa definida (8). As condições fisiológicas da doadora como: escore corporal, idade, raça e variação comportamental individual são aspectos biológicos que interferem nas taxas de prenhez. Animais subnutridos ou submetidos a situações de estresse são doadores de oócitos com menor capacidade de desenvolvimento (9).

Na maioria das vezes, as fêmeas que necessitam do auxílio da biotécnica de TO para produzir prenhez viável são as de idade mais avançada devido, principalmente, às alterações adquiridas durante a vida reprodutiva. A senilidade reduz a qualidade e a competência oocitária pela permanência destes gametas estacionados na fase de diplóteno, da prófase I da meiose até o momento do recrutamento (4). Assim, índices razoáveis de prenhez são possíveis, contudo o número de transferências necessárias para se obter produto de uma doadora idosa é maior quando comparado a uma doadora jovem (10).

### **Recuperação de oócitos *in vivo***

A recuperação de oócitos pode ser influenciada por terapias gonadotróficas, frequência da realização de técnicas, fase do ciclo estral; tamanho do folículo e experiência do profissional que realiza o procedimento (11).

Oócitos provenientes de folículos em desenvolvimento resultam em baixos índices de recuperação (7, 12). Isso acontece porque na fêmea equina, o folículo apresenta uma camada de células da teca logo abaixo da junção com o *cumulus*, fazendo com que o oócito fique mais aderido à parede folicular (10). Com o desenvolvimento do folículo, o índice de recuperação oocitária torna-se maior devido ao afrouxamento das junções entre as células do *cumulus* e a parede folicular. Isso ocorre em decorrência do aumento da concentração de LH em folículos pré ovulatórios ou com a aplicação exógena de hormônios (11). Outra vantagem da recuperação de oócitos proveniente de folículos pré-ovulatórios é a minimização da necessidade do cultivo e maturação *in vitro* (10).

Para a obtenção de oócitos em boas condições para transferência, alguns protocolos hormonais são utilizados com o objetivo de acelerar a maturação folicular e oocitária. Os hormônios utilizados com maior frequência para essa finalidade são hCG (gonadotrofina coriônica humana), GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e LH (hormônio luteinizante) (13).

A hCG vem sendo utilizada há muitos anos para auxiliar a maturação folicular, diminuindo o período de estro e acelerando a ovulação. Quando os folículos com diâmetro de aproximadamente 35 mm são detectados, a administração de hCG promove a ovulação em até 48 horas. Contudo, por se tratar de uma molécula glicoprotéica de elevado peso molecular, se for utilizada por repetidas vezes em uma mesma estação reprodutiva, pode induzir ação antigênica por parte do sistema imunológico. Assim, o GnRH e o LH têm sido utilizados como alternativa na sincronização e indução da ovulação em éguas (14).

Atualmente, a colheita dos oócitos é feita por meio de aspiração e lavagem dos folículos via transvaginal, guiada por ultrassonografia (TVA) (15), no entanto, punções pelo flanco ou laparotomia com exposição dos ovários e aspiração dos folículos foram relatadas com sucesso (10).

A punção dos folículos pelo flanco pode ser realizada com ou sem auxílio de ultrassonografia. Com a égua em estação, por meio da palpação transretal, o ovário é localizado e colocado próximo à parede abdominal, de modo que o folículo pré ovulatório possa ser alcançado pela agulha, que atravessará a musculatura do abdômen e a parede do folículo (16). Apesar de ser pouco utilizada nos dias de hoje, a punção pelo flanco apresenta bons resultados e tem como vantagem o fato de minimizar a necessidade de equipamentos sofisticados (17).

Outra técnica possível para obtenção de oócitos de éguas *in vivo* é a laparotomia, técnica que consiste na realização de uma incisão no flanco, exposição dos ovários e localização dos folículos. Com auxílio de agulhas e seringas ou bombas de vácuo, o fluido folicular é aspirado e, em seguida, lava-se o folículo. Depois de realizada a aspiração, o ovário é reposicionado e a sutura da parede abdominal é realizada (18).

A laparotomia pode ser utilizada em equinos, principalmente na falta de recursos para a realização de outros meios de recuperação de oócitos. Porém, por tratar-se de um procedimento cirúrgico, é um método invasivo, que pode trazer complicações posteriores (10).

Para a TVA, a fêmea é contida em estação, realiza-se o esvaziamento retal, higienização do períneo e sedação do animal. Por palpação transretal os ovários são manipulados e posicionados para que a imagem ultrassonográfica do ovário e dos folículos possa ser obtida, por meio de uma probe ultrassonográfica linear, convexa ou setorial, acoplada a um suporte e a uma agulha de aspiração (2, 10). A agulha normalmente utilizada para aspiração tem lúmen de 14 G (19) a 16 G (20), que pode ser simples ou duplo (2). A agulha de lúmen duplo tende a aumentar a taxa de recuperação de ovócitos devido à possibilidade de lavar o folículo, puncionado com solução de recuperação, o que faz com que o oócito se desprenda da parede do folículo com mais facilidade. Quando os ovários estão devidamente posicionados, e a imagem do folículo a ser aspirado é encontrada, a agulha é impulsionada suavemente para que atravesse a parede do fundo da vagina e do folículo, aspirando o fluido folicular, que é armazenado no copo coletor. Os níveis de pressão negativa utilizados na aspiração podem variar, havendo relatos de utilização de pressões de 90mmHg, 150mmHg, 230mmHg, 300mmHg e 400mmHg. A utilização de níveis de pressão muito altos pode causar lesões e desnudamento dos oócitos (2). Concomitante à aspiração, o folículo é lavado com 100 mL de solução tamponada e 10 UI/mL de heparina a 37°C para evitar coagulação do material aspirado (21). A aspiração transvaginal tem a vantagem de ser um procedimento não cirúrgico, e se realizada com cautela, pode ser repetida várias vezes, sem que a fertilidade da égua seja afetada (22).

A TVA é uma metodologia simples e eficiente na obtenção de oócitos de éguas subférteis, com doenças reprodutivas adquiridas e histórico de insucesso nos programas de transferência de embriões (TE) (11, 23).

Após a aspiração, realiza-se a busca e a classificação do(s) oócito(s) em estereomicroscópio binocular na solução de aspiração. Quando localizados, os gametas são transferidos para os meios de cultura, onde recebem condições para serem imediatamente transferidos, maturados *in vitro* ou até mesmo criopreservados (7).

### **Recuperação de ovócitos *post-mortem***

Em animais abatidos em matadouro ou animais valiosos que vieram a óbito, a recuperação dos oócitos pode ser realizada por meio de punção folicular, curetagem da parede folicular (scraping) e fatiamento do ovário (slicing) ou até mesmo pela combinação destas técnicas (24).

Os ovários de éguas abatidas em matadouro são as fontes mais abundantes de gametas, porém, nem sempre é possível conhecer a fêmea doadora, por isso a qualidade dos oócitos e a genética a ser transmitida não são garantidas (10), no entanto, são excelentes modelos experimentais, e material de treinamento para que éguas valiosas que venham a óbito tenham os oócitos utilizados.

É importante salientar que a temperatura e o tempo transcorrido durante o transporte dos ovários influenciam na competência meiótica dos oócitos e a taxa de desenvolvimento embrionário (17). A temperatura pode diminuir a viabilidade do oócito por interferir na estrutura da membrana oocitária (23, 25), assim como, quanto maior o período de transporte dos ovários até o laboratório, menor a taxa de maturação dos oócitos e, conseqüentemente, do desenvolvimento embrionário (26). Uma alternativa para aumentar a viabilidade dos oócitos *post-mortem* é a aspiração ou curetagem dos folículos no próprio local de abate, com transporte dos oócitos até o laboratório em meio de maturação e em incubadoras portáteis, podendo, assim, favorecer as taxas de concepção (17).

Nos casos em que os oócitos provenientes de ovários conservados post-mortem são a última possibilidade de obter descendentes de uma fêmea morta, o transporte e a recuperação dos gametas devem ser realizados de forma cautelosa, a fim de maximizar a taxa de recuperação. Os oócitos são coletados em diversas fases do ciclo, o que gera a necessidade de serem maturados *in vitro* até atingirem a fase meiótica ideal para transferência (25).

Para a coleta dos oócitos, as túnicas vaginal e albugínea são retiradas, os ovários são lavados em solução tamponada para remover o sangue e debris celulares (11). No laboratório, os folículos em vários estágios de desenvolvimento são identificados e aspirados. Independente da técnica de coleta selecionada é importante associar a curetagem da parede folicular para que o oócito possa ser recuperado, respeitando a anatomia da fêmea equina (26). A curetagem da parede folicular permite ótimos índices de recuperação, com pouca ocorrência de lesões no complexo *cumulus oophorus*, porém trata-se de uma atividade laboriosa, que consome muito tempo para sua realização (24).

O líquido resultante dos procedimentos de lavagem folicular é mantido aquecido a 37°C em béquer por 20 minutos, quando o sobrenadante é desprezado e o sedimento é examinado para a identificação dos oócitos sob estereó-microscopia (9).

Outra técnica descrita é o fatiamento ovariano, que consiste no corte dos ovários em partes de aproximadamente cinco milímetros de espessura. As fatias são lavadas com solução tamponada, acrescida de 10 UI/mL e a 37°C. O líquido resultante da lavagem é deixado em descanso por 20 minutos, para que ocorra a sedimentação dos oócitos (27). A técnica de fatiamento ovariano demonstra ser uma técnica prática e rápida, porém não se pode determinar o tamanho dos folículos utilizados, resultando em populações heterogêneas de oócitos (28).

Apesar da variabilidade de opções, o sucesso da técnica ainda não é satisfatório. No ano de 2003 Carnevale e seus colaboradores reportaram o nascimento do primeiro potro proveniente de TO, advindo de ovários de abatedouro. Desde então, as taxas de obtenções de oócitos e de desenvolvimento embrionário, a partir de TO maturados *in vitro*, recuperados de éguas mortas, permanecem ao redor de 15 % e 12, 8% de sucesso respectivamente (25, 28). Deleuze et al. (12) obtiveram cerca de 40% de sucesso na obtenção de embriões, a partir de oócitos maturados *in vitro*. Todavia, mesmo nessa relação com taxas de maturação *in vivo* em torno de 70%, o rendimento permanece menor quando comparados às taxas de produção de embriões e gestações obtidas com a utilização de oócitos provenientes de folículos pré ovulatórios.

### **Avaliação e classificação morfológica de oócitos recuperados**

Após a recuperação dos oócitos, os mesmos devem ser avaliados e classificados para o cultivo *in vitro* ou para a transferência direta à receptora (25).

O oócito equino pode ter seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário, estimado pelas características do complexo *cumulus oophorus*. Oócitos com maior viabilidade, em geral, apresentam ooplasma homogêneo, de coloração marrom, granulações finas e devem estar completamente envolvidos ao menos por uma camada completa de células do *cumulus* (24).

### **Fêmeas receptoras de oócitos**

Para que haja melhor resultado com esta biotécnica, é recomendado que as fêmeas utilizadas como receptoras sejam jovens, saudáveis, férteis, com habilidade materna e não apresentem histórico de distocias (7). Preferencialmente são selecionadas fêmeas entre três e dez anos de idade, consideradas aptas em exame ginecológico (8). O aparelho reprodutivo das

receptoras deve fornecer as condições necessárias para ocorrer fertilização, desenvolvimento embrionário e fetal (10).

A utilização de éguas receptoras em atividade cíclica favorece o transporte espermático, a capacitação dos gametas e a fertilização. Éguas não cíclicas devem ser tratadas hormonalmente para que apresentem as características cíclicas do período folicular, desta forma apresentem trato reprodutivo, apto a receber os gametas, fornecendo as condições necessárias para que ocorra a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário. A fim de evitar a fecundação dos oócitos, quando se opta pela utilização de fêmea cíclica, faz-se necessário realizar aspiração folicular antes da transferência oocitária, evitando assim a fertilização do oócito da própria receptora (15).

### **A transferência do oócito**

O período de competência para fertilização após a TO é o período em que os gametas estão aptos à fertilização para o desenvolvimento embrionário normal. O transporte de gametas está altamente relacionado com a taxa de concepção. Nos sistemas de monta natural, os espermatozoides são depositados no trato reprodutivo da fêmea entre dez e doze horas antes da ovulação (29). Por este motivo, em protocolos de TO, a inseminação artificial deve ser realizada entre doze horas antes e duas horas após a transferência do oócito. No entanto, o momento ideal da inseminação depende da qualidade e do tipo de conservação do sêmen utilizado (2).

Se a inseminação for realizada tardiamente, existe o risco de haver a degeneração dos oócitos, sendo o período crítico nas fêmeas equinas entre seis e oito horas. Oócitos degenerados ou envelhecidos têm viabilidade alterada, perdendo a capacidade de serem fertilizados, ou quando fertilizados, favorecendo a formação do zigoto com número incorreto de cromossomos, podendo resultar em morte embrionária precoce (24). Os procedimentos cirúrgicos para GIFT e para TO podem ser realizados com o animal em estação, por meio da laparotomia pelo flanco, utilizando sedação e anestesia local. Assim, após a higienização da área cirúrgica, é realizada a incisão de aproximadamente 15 cm de extensão no flanco, na linha média entre a última costela e a tuberosidade coxal. Os músculos são afastados para que o ovário seja localizado na cavidade abdominal. Após a localização, ovário e oviduto são expostos, e o infundíbulo é localizado. Oócito, ou oócitos e espermatozoides (no caso da GIFT) são transferidos em aproximadamente 0,2 ml de meio de cultivo com auxílio de pipeta de vidro de ponta fina e arredondada, introduzida 2 a 3 cm dentro do infundíbulo. Após a realização da transferência, o ovário é reposicionado, e os planos musculares e pele são suturados (21).

No pós operatório, as receptoras são tratadas com antibiótico e antiinflamatório durante cinco dias após a TO (22). Adicionalmente, são administrados 200mg/dia de progesterona na receptora para garantir a manutenção da gestação, até a confirmação do diagnóstico de prenhez nos dias 15 e 90 após a transferência (8).

### **Taxas de concepção**

O sucesso da TO depende de vários fatores. Um dos mais importantes tange a origem do oócito e a dificuldade de maturá-los *in vitro*, resultando em taxas de desenvolvimento embrionário de oócitos, originários de folículos pré ovulatórios, maturados *in vivo*, mais elevadas que as taxas de desenvolvimento de oócitos maturados *in vitro* (13). Estudos realizados por Scott et al. (9) resultaram em 92% de vesículas embrionárias após a transferência de oócitos provenientes de folículos pré ovulatórios e, somente 7%, quando provenientes de folículos imaturos que necessitaram da maturação *in vitro*.

A qualidade e o tipo de conservação do sêmen também interferem nos resultados. Sêmen de garanhões férteis, com boa motilidade e concentração, resultaram em índices mais satisfatórios de prenhez quando comparados a sêmen de garanhões com menor qualidade. Assim, tanto na TO quanto na GIFT, o sêmen fresco resulta em maior desenvolvimento de vesículas embrionárias quando comparado ao sêmen refrigerado ou congelado (13).

As idades das doadoras e receptoras determinam fator importante no sucesso da concepção por meio de TO. Oócitos de doadoras jovens transferidos para receptoras também jovens podem apresentar taxas de fertilidade superiores a 92%. O índice cai para 31% quando oócitos provenientes de doadoras velhas são transferidos para receptoras jovens (13).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os progressos das biotécnicas da reprodução nos equinos são lentos quando comparados a outras espécies, isso se deve primariamente ao grande número de particularidades anatomofuncionais inerentes à espécie e também pela escassa disponibilidade de material para pesquisa, o que resulta em aspectos da fisiologia ainda sem repetibilidade no laboratório. Assim, para que a eficiência da TO aumente é necessária a realização de mais estudos no que diz respeito à maturação *in vitro*, conservação dos ovários *post-mortem* e superovulação, como importantes ferramentas para aumentar o número e competência dos oócitos recuperados, promovendo que biotécnicas, como a TO, possam ter todo o potencial explorado.

## REFERÊNCIAS

1. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Brasília: CNA; 2004. [Coletânea Estudos Gleba, n.39].
2. Rodrigues R. Aspiração folicular por via transvaginal guiada por ultra-som em equinos [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
3. Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas a reprodução Animal. São Paulo: Livraria Varela; 2001.
4. Carnevale EM, Frank-Guest BL, Stokes JE. Effect of equine oocyte donor age on success of oocyte transfer and intracytoplasmic sperm injection. *Anim Reprod Sci.* 2010;121:S258-9.
5. Ribeiro BI, Love LB, Choi YH, Hinrichs K. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Anim Reprod Sci.* 2008;108:171-9.
6. Silva MAC. When should a mare go for assisted reproduction? *Theriogenology.* 2008;70:441-4.
7. Carnevale EM, Maclellan MA, Silva MAC, Checure CM, Scoggin CF, Squires EL. Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. *Anim Reprod Sci.* 2001;68:305-14.
8. Carnevale EM, Silva MAC, Panzani D, Stokes JE, Squires EL. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology.* 2005;64:519-27.

9. Scott TJ, Carnevale EM, Maclellan LJ, Scoggin CF, Squires EL. Embryo development rates after transfer of oocytes matured in vivo, in vitro, or within oviducts of mares. *Theriogenology*. 2001;55:705-15.
10. Carnevale EM, Silva MAC, Maclellan LJ, Seidel Junior GE, Squires EL. Use of parentage testing to determine optimum insemination time and culture media for oocyte transfer in mares. *Reproduction*. 2004;128:623-8.
11. Fernandes CB, Peres KR, Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC. The use of transmission electron microscopy and oocyte transfer to evaluate in vitro maturation of equine oocytes in different culture conditions. *J Equine Vet Sci*. 2006;26:4.
12. Deleuze S, Goudet G, Caillaud M, Lahuec C, Duchamp G. Efficiency of embryonic development after intrafollicular and intraoviductal transfer of in vitro and in vivo matured horse oocytes. *Theriogenology*. 2009;72:203-9.
13. Squires EL, Carnevale EM, Mccue PM, Bruemmer JE. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*. 2003;59:151-70.
14. Imboden I, Janett F, Burger D, Crowe MA, Hässig M, Thun R. Influence of immunization against GnRH on reproductive cyclicity and estrous behavior in the mare. *Theriogenology*. 2006;66:1866-75.
15. Bruck I, Raun K, Synnestvedt B, Greve T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. *Equine Vet J*. 1992;24:58-9.
16. Hinrichs K, Kenney RM. A colpotomy procedure to increase oocyte recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles. *Theriogenology*. 1987;27:237.
17. Carnevale EM, Maclellan LJ. Collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2006;22:843-56.
18. Vogelsang MM, Kreider JL, Bowen MJ, Potter GD, Forrest DW, Kraemer DC. Methods for collecting follicular from mares. *Theriogenology*. 1988;29:1007-8.
19. Hinrichs K, Kenney DF, Kenney RM. Aspiration of oocyte from mature and immature preovulatory follicles in the mare. *Theriogenology*. 1990;27:237.
20. Mari G, Barbara M, Eleonora I, Stefano B. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound- guided aspirations. *Anim Reprod Sci*. 2005;88:299-308.
21. McKinnon AO, Carnevale EM, Maclellan LJ, Preis KA, Seidel Jr GE. Heterogenous and xenogenous fertilization of in vitro matured equine oocyte. *J Equine Vet Sci*. 1988;8:143-7.
22. Silva MAC, Carnevale EM, Maclellan LJ, Preis KA, Seidel Junior GE, Squires EL. Oocyte transfer in mares with intrauterine or intraoviductal insemination using fresh, cooled, and frozen stallion semen. *Theriogenology*. 2004;61:705-13.

23. Landim-Alvarenga FC, Alvarenga MA. Structural aspects of equine oocytes matured in vivo and in vitro. *Braz J Morphol Sci.* 2006;23:513-24.
24. Curcio BR. Maturação e vitrificação de ovócitos equinos incubados em meios contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhantes à insulina-I [dissertação]. Pelotas: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas; 2005.
25. Preis KA, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Caracciolo di Brienza V, Gomes GM, Maclellan LJ, et al. In vitro maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22 degrees C. *Theriogenology.* 2004;61:1215-23.
26. Ribeiro BI, Love LB, Choi YH, Hinrichs K. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Anim Reprod Sci.* 2008;108:171-9.
27. Choi YH, Hoshi S, Braun J, Sato K, Oguri N. In vitro maturation of equine oocyte collected by follicle aspiration and by slicing of ovaries. *Theriogenology.* 1993;40:959-66.
28. Fernandes CB. Maturação in vitro de ovócitos equinos: comparação entre os meios TCM 199, SOFaa e HTF:BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH equino e do hormônio de crescimento equino, utilizando a transferência de ovócitos [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista; 2004.
29. Souza FA. Taxa de concepção de éguas cobertas 12 ou 24 horas após a ovulação [dissertação]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

**Recebido em: 22/09/11**

**Aceito em: 14/08/12**

## PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*: ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Letícia Ferrari Crocomo<sup>1\*</sup>  
Wolff Camargo Marques Filho<sup>2</sup>  
Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga<sup>3\*</sup>  
Sony Dimas Bicudo<sup>3\*</sup>

### RESUMO

A produção contínua e excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) associada à depleção da concentração intracelular de glutathione (GSH) são as principais causas da baixa eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIV) em diversas espécies animais. Isto se deve às condições de cultivo *in vitro* e à ausência do sistema de defesa antioxidante materno. Dentre os efeitos deletérios do estresse oxidativo, a peroxidação lipídica tem sido relacionada com o bloqueio do desenvolvimento e redução da viabilidade oocitária e embrionária. Neste contexto, a suplementação dos meios de cultivo *in vitro* com compostos tióis tem sido proposta com intuito de reduzir as perdas decorrentes do estresse oxidativo. Sendo assim, dada a relevância do tema, esta revisão visa proporcionar melhor compreensão dos eventos bioquímicos envolvidos na formação das EROs, na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante glutathione reductase/peroxidase, com enfoque aos oócitos e embriões, e discutir alternativas para melhorar a eficiência da PIV.

**Palavras-chave:** oócito, embrião, glutathione, compostos tióis, lipoperoxidação

### *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION: OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANTS

### ABSTRACT

The continuous and excessive production of reactive oxygen species (EROs) associated with the depletion of intracellular concentration of glutathione (GSH) are the main cause of low efficiency of *in vitro* embryo production (PIV) in several animal species. It is due the *in vitro* culture conditions and the absence of the maternal antioxidant defense system. Among the deleterious effects of oxidative stress, lipid peroxidation has been related to the development block and reduction of the oocyte and embryo viability. In this context, the supplementation of the *in vitro* culture media with thiol compound has been proposed in order to reduce losses resulting from oxidative stress. Thus, considering the topic relevance, this review aims to provide better understanding of the biochemical events involved in the EROs formation, lipid peroxidation and antioxidant defense system glutathione reductase/peroxidase, focusing on oocytes and embryos, and to discuss alternatives to improve the PIV efficiency.

**Keywords:** oocyte, embryo, glutathione, thiol compounds, lipoperoxidation

<sup>1</sup> Médica Veterinária doutoranda em Reprodução Animal, bolsista FAPESP, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: lfrocomo@hotmail.com.

<sup>2</sup> Pós-graduando da FMVZ-UNESP Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Prof. Dr. do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP, Botucatu, São Paulo

\* Correspondência: Distrito de Rubião Jr, s/n, CEP 18618-000 Botucatu – SP

## PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*: EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LOS ANTIOXIDANTES

### RESUMEN

La producción continua y excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROs) asociada con la depleción de glutatión (GSH) intracelular son las principales causas de la baja eficiencia en la producción de embriones *in vitro* (PIV) en varias especies animales. Esto es debido a las condiciones de cultivo *in vitro* y a la ausencia del sistema de defensa antioxidante materno. Entre los efectos nocivos del estrés oxidativo, la peroxidación lipídica se ha relacionado con el bloqueo del desarrollo y la reducción de la viabilidad de ovocitos y embriones. En este contexto, se ha propuesto la suplementación de los medios de cultivo *in vitro* con compuestos tiol con el fin de reducir las pérdidas resultantes del estrés oxidativo. Así, dada la relevancia del tema, esta revisión tiene como objetivo proporcionar una mejor comprensión de los eventos bioquímicos que intervienen en la formación de las EROs, en la peroxidación lipídica y en el sistema de defensa antioxidante glutatión reductasa / peroxidasa, con enfoque en ovocitos y embriones, y discutir alternativas para mejorar la eficiencia de la PIV.

**Palabras clave:** ovocitos, embriones, glutatión, compuestos tiol, peroxidación lipídica

### INTRODUÇÃO

Apesar dos recentes avanços biotecnológicos, a eficiência da PIV em diferentes espécies animais ainda é baixa quando comparada aos resultados obtidos *in vivo* (1-3). Dentre os fatores implicados neste contexto, a qualidade dos oócitos e as condições dos sistemas de maturação oocitária e cultivo embrionário *in vitro* são determinantes (4, 5).

*In vitro*, a produção de EROs é favorecida pela alta tensão de oxigênio (O<sub>2</sub>) associada à interferência da luz, à presença de espermatozoides e à ausência da proteção antioxidante materna. Para reestabelecer o potencial redox intracelular, grande quantidade de glutatona é mobilizada resultando em maior susceptibilidade ao estresse oxidativo (6, 7). Como consequência, reações em cadeia são desencadeadas promovendo danos celulares que resultam em altas taxas de apoptose e bloqueio da meiose oocitária e do desenvolvimento embrionário *in vitro* (8, 9).

Neste contexto, a suplementação dos meios de maturação oocitária (MIV) e cultivo embrionário *in vitro* (CIV) com compostos tióis, capazes de incrementar o sistema de defesa antioxidante intracelular, tem sido proposta com intuito de melhorar eficiência da PIV (10, 11).

Deste modo, dada a relevância do tema, esta revisão visa ampliar o conhecimento referente aos eventos bioquímicos envolvidos na formação das EROs, na lipoperoxidação e no sistema de defesa antioxidante glutatona reductase/peroxidase ao longo do desenvolvimento oocitário e embrionário tanto *in vivo* como *in vitro*. Alternativas para incrementar a eficiência da PIV pela utilização de antioxidantes nos meios de cultivo *in vitro* também serão abordadas.

### ESTRESSE OXIDATIVO

Consiste num termo genérico dado à situação em que existe desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e as substâncias antioxidantes, com predominância das primeiras. Nos sistemas de cultivo *in vitro*, o estresse oxidativo consiste numa das principais causas da baixa eficiência da maturação oocitária e desenvolvimento embrionário em várias espécies (8, 12). Além disso, está envolvido no envelhecimento celular e na patogênese de

muitas doenças como o câncer, ataque cardíaco, derrame, diabetes, doenças hepáticas entre outras (13).

As EROs são naturalmente geradas durante o metabolismo aeróbico, mesmo em condições basais (9). Deste modo, estão presentes em todos os tipos celulares. Numa situação de equilíbrio, exercem efeitos benéficos atuando como moléculas sinalizadoras em processos fisiológicos como na regeneração tecidual, sinalização hormonal, esteroidogênese, regulação redox intracelular e embriogênese (14).

No entanto, quando a concentração crítica de EROs é ultrapassada, ocorrem efeitos prejudiciais às células, resultando em alteração e morte celular (8). Além do metabolismo intracelular, o estresse oxidativo também pode ser favorecido pelas condições ambientais às quais oócitos e embriões são submetidos durante a PIV. Tais condições envolvem a concentração de oxigênio, presença de espermatozoides, constituintes do meio e exposição à luz ou calor (9).

## FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Durante a respiração celular, a molécula de oxigênio ( $O_2$ ) deve receber quatro elétrons e ser completamente reduzida a duas moléculas de água ( $H_2O$ ). Se o  $O_2$  for parcialmente reduzido pela recepção de somente 1 elétron, o produto desta redução será o radical superóxido ( $O_2^-$ ). Este radical, ao receber mais um elétron e 2 íons de hidrogênio, formará o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Da reação entre o peróxido de hidrogênio e íons de ferro ou cobre ocorrerá a formação do radical hidroxila ( $OH$ ), considerado o mais reativo (Figura 1). Este último também poder ser formado pela reação entre o peróxido de hidrogênio e superóxido (15, 16).

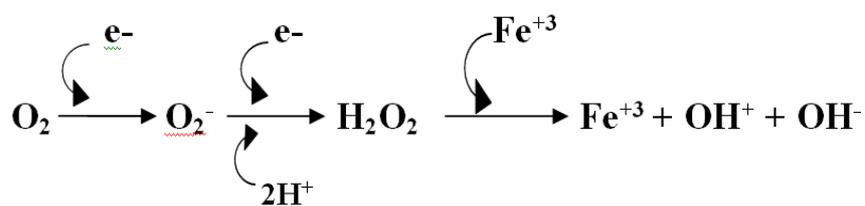


Figura 1. Reações químicas que resultam na formação das espécies reativas de oxigênio. Modificado de Ferreira e Matsubara (15).

Os radicais superóxidos e hidroxilas são considerados radicais livres, pois possuem elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa. O peróxido de hidrogênio, apesar de não ser um radical livre, representa um metabólito parcialmente reduzido (17). Logo, todos estes metabólitos derivados do oxigênio são denominados espécies reativas de oxigênio em função da elevada instabilidade e reatividade (18).

Para se tornarem estáveis, as EROs precisam adquirir elétrons. Sendo assim, reagem com quaisquer moléculas ao seu redor (lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos) provocando a oxidação destas. Como consequência, reações em cadeia são desencadeadas resultando em danos celulares que incluem: peroxidação lipídica, alterações mitocondriais, desnaturação protéica, bloqueio no desenvolvimento embrionário, redução da motilidade espermática, alteração do fuso meiótico, depleção de ATP e apoptose celular (8, 9).

## PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA OU LIPOPEROXIDAÇÃO

Definida como “a deteriorização oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI)”, a lipoperoxidação consiste numa reação em cadeia desencadeada pela ação das EROs sobre os

AGPI, resultando em alterações celulares irreversíveis (19). Devido a isso, é considerada um dos mais importantes efeitos citotóxicos decorrentes do estresse oxidativo (20).

O processo de lipoperoxidação se inicia com o sequestro de um átomo de hidrogênio dos AGPI pelas EROs. Por ser mais instável e reativo, o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) é considerado o agente desencadeador da reação. Como consequência, há formação de radicais lipídicos alquila ( $\text{L}^\cdot$ ), que rapidamente reagem com uma molécula de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) formando os radicais peroxila ( $\text{LOO}^\cdot$ ). Estes, por sua vez, para se estabilizarem, abstraem átomos de hidrogênio dos AGPI, resultando na formação de novos radicais lipídicos. Esta reação em cadeia se propaga até os radicais lipídicos destruírem a si próprios (15, 21), conforme demonstrado na figura 2.



Figura 2. Reações químicas que representam a lipoperoxidação. Modificado de Ferreira e Matsubara (15).

Dentre os componentes celulares, as membranas são mais susceptíveis à deteriorização lipídica, devido à grande quantidade de AGPI. As alterações decorrentes deste processo incluem: destruição da estrutura e alteração da permeabilidade das membranas celulares. Consequentemente, há perda da seletividade para entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas, liberação do conteúdo das organelas, formação de produtos citotóxicos e alteração do DNA, culminando com a morte celular (22, 23).

Nas biotecnologias reprodutivas, a lipoperoxidação decorrente do estresse oxidativo é considerada uma das principais causas da baixa fertilidade dos espermatozoides submetidos aos processos de criopreservação e da baixa eficiência dos sistemas de cultivo oocitário e embrionário *in vitro* (24, 25).

Evidências indicam que o excesso de EROs na PIV induz o bloqueio do desenvolvimento e compromete a viabilidade oocitária e embrionária. Estes comprometimentos ocorrem devido às lesões estruturais e funcionais promovidas pela deteriorização oxidativa dos AGPI (6).

## SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

As EROs são continuamente geradas como consequência direta do metabolismo de  $\text{O}_2$  (9). Como proteção aos efeitos nocivos do excesso de metabólitos de oxigênio, o organismo dispõe de dois sistemas antioxidantes: não enzimáticos e enzimáticos. Estes atuam em diferentes níveis de proteção: inibindo a formação e ação oxidativa das EROs, e reparando as lesões provocadas pelos metabólitos oxidativos (26).

### Sistema antioxidante não enzimático

Inclui compostos de baixo peso molecular presentes na dieta como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), selênio, zinco, taurinas, hipotaurinas, caroteno, ácido lipóico (9). Também são incluídos os compostos tióis como: cistina, cisteína, cisteamina e beta-mercaptoetanol, utilizados nos meios de cultivo oocitário e embrionário *in vitro* (10).

## Sistema antioxidante enzimático

Inclui as enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxirredoxinas e o sistema glutaciona redutase / peroxidase. A superóxido dismutase é responsável por catalisar a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, enquanto que as peroxirredoxinas degradam o peróxido de hidrogênio e a catalase o converte à água e oxigênio. Já o sistema glutaciona redutase / peroxidase consiste no mecanismo de defesa primário para remoção das EROs (15, 18).

## SISTEMA GLUTATIONA REDUTASE/PEROXIDASE

A Glutaciona é o maior e mais importante composto tiol-sulfidril não protéico, presente em todas as células dos mamíferos. Consiste num tripeptídeo formado pelos aminoácidos: glutamato, glicina e cisteína. Este composto está envolvido em inúmeras funções biológicas, sendo conhecido principalmente pelo seu potencial de proteger as células contra os efeitos citotóxicos das EROs e manter o potencial redox intracelular (12).

No organismo, se apresenta sob 2 formas: glutaciona reduzida (**GSH**), que apresenta capacidade redutora determinada pelo grupamento sulfidril (-SH) e é predominante no meio intracelular; e a glutaciona oxidada (**GSSG**), que é um dissulfeto resultante da oxidação da GSH após sua exposição ao agente oxidante (27).

No processo de neutralização das EROs, a glutaciona opera em ciclos entre a sua forma reduzida e oxidada. As reações de redução e oxidação são catalisadas pelas enzimas glutaciona peroxidase (GPx) e redutase (GR) e ocorrem na presença de selênio e NADPH, respectivamente (12).

Conforme representado na figura 3, a glutaciona peroxidase catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio à água, utilizando a GSH como agente redutor que, conseqüentemente, é convertida à sua forma oxidada (GSSG). Numa situação de equilíbrio, a glutaciona redutase imediatamente converte a GSSG à sua forma reduzida (GSH), utilizando o NADPH como agente redutor (27, 28).

A recuperação da GSH é essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. Este processo depende da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) que é gerada pela oxidação da glicose na via das pentoses-fosfato (12). Qualquer desequilíbrio neste processo resultará em menor contração intracelular de GSH favorecendo o estresse oxidativo.

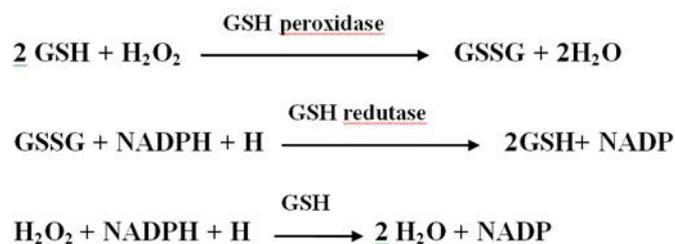


Figura 3. Reações químicas que representam a dismutação do peróxido de hidrogênio pelo sistema glutaciona redutase/ peroxidase. Modificado de Lubberda (12).

## GLUTATIONA DURANTE O DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO E EMBRIONÁRIO *IN VIVO* X *IN VITRO*

Devido às suas inúmeras funções biológicas, em especial à atividade antioxidante, a glutaciona está diretamente relacionada ao potencial de desenvolvimento oocitário e embrionário tanto *in vivo* como *in vitro* (12).

Evidências indicam que a concentração intraoocitária de glutaciona aumenta ao longo da maturação, de modo que, oócitos no estadió de metáfase II apresentam o dobro da quantidade

de GSH detectada no estágio de vesícula germinativa. Esta síntese de GSH durante a maturação pode ser regulada por gonadotrofinas (29).

No entanto, no estágio inicial do desenvolvimento embrionário, o nível de GSH diminui rapidamente, sendo que sua síntese é retomada apenas com a ativação do genoma embrionário. Logo, o estoque de GSH intraoocitário assegura a proteção contra as EROs durante a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial e, conseqüentemente, determina a competência oocitária (30, 31).

Além da ação antioxidante, a GSH participa ativamente na descondensação do material genético espermático, formação do pronúcleo masculino e manutenção do potencial redox intracelular (32). Deste modo, a glutathiona, em sua forma reduzida, pode ser considerada um potencial marcador bioquímico da maturação, viabilidade e potencial de desenvolvimento oocitário (29).

No entanto, nos oócitos maturados *in vitro*, a concentração intracelular de GSH é bem menor do detectado *in vivo*. Isto se deve à elevada e contínua produção de EROs nos sistemas de cultivo *in vitro* decorrente da elevada concentração de O<sub>2</sub>, interferência da luz e presença de espermatozoides. Estas condições resultam em maior mobilização da GSH e, conseqüentemente, maior susceptibilidade ao estresse oxidativo (6, 7).

Além disso, *in vivo*, os oócitos e embriões estão protegidos contra o estresse oxidativo pela presença de antioxidantes no fluido folicular e oviduto (33). No entanto, na PIV, os oócitos são removidos do ambiente natural e submetidos às condições de cultivo distintas do fisiológico o que favorece o estresse oxidativo (6). Como consequência, podem ser constatadas alterações mitocondriais, apoptose, bloqueio da meiose oocitária e do desenvolvimento embrionário (8).

Neste contexto, com intuito de minimizar os efeitos citotóxicos decorrentes do estresse oxidativo e conseqüentemente melhorar a eficiência da PIV, tem sido proposto a suplementação dos meios de cultivo oocitário e embrionário com antioxidantes (10, 11), e a redução da tensão de oxigênio a níveis mais próximos do fisiológico (5%) (5).

## ANTIOXIDANTES NO MEIO DE CULTIVO *IN VITRO*

A síntese de GSH nos oócitos e embriões depende da disponibilidade de aminoácidos precursores no meio extracelular e de um sistema de transporte destes aminoácidos pela membrana plasmática (34). Baseado nisso, os meios de cultivo padrão, como TCM199, são normalmente enriquecidos com aminoácidos como cisteína e/ou cistina (35).

Efeitos benéficos da cisteína nos meios MIV e CIV têm sido relatados em bovinos e suínos, no entanto, ainda existe discrepância entre autores com relação aos resultados obtidos (36, 37). Apesar de a cisteína ser diretamente aproveitada pelo oócito e embrião para síntese de glutathiona, sua estabilidade no meio extracelular é muito baixa, sendo oxidada em cistina em uma hora de cultivo (38).

Evidências indicam ainda que tanto oócitos desnudos como embriões não conseguem utilizar a cistina presente no meio de cultivo, provavelmente pela ausência de um sistema de transporte transmembrana de cistina ou pela incapacidade de conversão desta em cisteína (10, 39).

Neste contexto, as células do *cumulus* desempenham importante função, uma vez que, conseguem recuperar a cistina do meio e convertê-la em cisteína. Além disso, sintetizam GSH que juntamente com cisteína são transferidas ao oócito pelas junções GAP (39, 40). Evidências indicam incremento no nível intracelular de GSH quando oócitos desnudos são cultivados na presença de complexos *cumulus*-oócitos intactos (41) ou monocamada de células do *cumulus* (35).

Deste modo, o estoque intraocitário de glutatona está diretamente relacionado à presença do *cumulus* (42), sendo favorecido pela íntima comunicação destas células com o oócito pelas junções GAP.

Neste contexto, a adição de compostos tióis de baixo peso molecular como a cisteamina e o  $\beta$ -mercaptoetanol aos meios de cultivo *in vitro* suplementados com cistina e/ou cisteína consiste numa alternativa para incrementar a concentração intracelular de GSH. Evidências indicam que tal estratégia resulta em maior eficiência da PIV (3, 43).

Os compostos tióis têm a capacidade de converter a cistina em cisteína, que é diretamente aproveitada tanto pelos oócitos como embriões. Além disso, impedem a oxidação da cisteína, aumentando a sua disponibilidade no meio extra e intracelular. Como consequência, há incremento da síntese de GSH resultando em maior viabilidade oocitária e embrionária (44, 45).

Estudos relatam ainda maiores taxas de blastocistos e redução da apoptose, em diferentes espécies animais, quando os meios MIV e CIV foram suplementados com cisteamina e/ou beta-mercaptoetanol associados à cistina e/ou cisteína (34, 43, 44, 46). Vale ressaltar, no entanto, que os efeitos positivos ou negativos do uso de antioxidantes dependem da concentração destes no meio extracelular, do tempo de cultivo e da espécie animal em questão (3).

Enquanto na MIV e CIV, a adição de antioxidantes promove efeitos benéficos, supõe-se que o meio de fertilização *in vitro* (FIV) não deve conter antioxidante uma vez que as EROs são fundamentais para hiperativação, capacitação e reação acrossômica dos espermatozoides (31).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme exposto, as condições de cultivo *in vitro* favorecem o estresse oxidativo que interfere negativamente na PIV. Modificações nestas condições, como suplementação dos meios de cultivo com compostos tióis e baixas concentrações de oxigênio tem sido propostas como alternativas para aumentar a viabilidade dos oócitos e embriões. Apesar dos resultados satisfatórios obtidos, acredita-se que o estudo aprofundado dos aspectos bioquímicos e moleculares do fluido folicular e do ambiente uterino é imprescindível para reprodução de condições de cultivo *in vitro* semelhantes ao fisiológico, resultando em melhor eficiência de biotecnologias reprodutivas como a PIV.

## REFERÊNCIAS

1. Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*. 2002;57:2105-17.
2. Zicarelli L, Donnay I, De Rosa A, Boccia L, Monaco E, Attanasio L, et al. Use of thiol compounds during *in vitro* maturation of buffalo oocytes: effects on embryo development. *Ital J Anim Sci*. 2005;4:304-6.
3. Choe C, Shin YW, Kim EJ, Cho SR, Kim HJ, Choi SH, et al. Synergistic effects of glutathione and  $\beta$ -mercaptoethanol treatment during *in vitro* maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine. *J Reprod Dev*. 2010;56:575-82.
4. Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci*. 2004;82:E14-E23.

5. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*. 2004; 62:1186-97.
6. Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril*. 2002;78:1272-7.
7. Livingston T, Rich K, Mackenzie S, Godkin JD. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of *in vivo* matured sheep oocytes. *Anim Reprod Sci*. 2009;116:265-73.
8. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:1-21.
9. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 2001;7:175-89.
10. De Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG. Effect of glutathione stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*. 2002;57:1443-51.
11. Urdaneta A, Jiménez AR, Paramio M, Izquierdo D. Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote*. 2004;12:277-84.
12. Lubberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*. 2005;5:5-17.
13. Wu G, Fang Y, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004;134:489-92.
14. Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:1375-403.
15. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*. 1997;43:1-16.
16. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother*. 1999;53:169-80.
17. Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*. 2004;10:308-13.
18. Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:1287-312.
19. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cienc Farm*. 2001;37:293-303.

20. McBride JM, Kraemer WJ. Free radicals, exercise and antioxidantes. J Strength Cond Res. 1999;13:175-83.
21. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in biology and medicine. 3<sup>a</sup> ed. New York: Oxford Science Press; 1999.
22. Mello Filho AC, Hoffman ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. Biochem J. 1983;218:273-5.
23. Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. Semin Hematol. 1989;26:277-85.
24. Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stages embryos developed in vitro or in vivo. Development. 1990;109:501-7.
25. Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. Mol Reprod Dev. 2001;59:451-8.
26. Sies H. Strategies of antioxidant defense - review. Eur J Biochem. 1993;215:213-9.
27. Meister A, Anderson ME. Glutathione. Ann Rev Biochem. 1983;52:711-60.
28. Hall AG. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. Eur J Clin Invest. 1999;29:238-45.
29. Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD. Glutathione (GSH) concentration vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and preimplantation stage embryos. Mol Reprod Dev. 2003;64:106-12.
30. De Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of B-mercaptoethanol, cysteine and cystine. Theriogenology. 2000;53:761-71.
31. Stradaoli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. Theriogenology. 2007;67:1249-55.
32. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN. Presence of b-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. Theriogenology. 1998;50:747-56.
33. Lapointe J, Bilodeau JF. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. Biol Reprod. 2003;68:1157-64.
34. Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, et al. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. Theriogenology. 2006;65:275-87.

35. De Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod.* 1997;57:1420-5.
36. Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirement for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology.* 2003;59:939-49.
37. Katayama M, Reike A, Cantley T, Murphy C, Dowell L, Sutovsky P, et al. Improved fertilization and embryo development resulting in birth of live piglets after intracytoplasmic sperm injection and in vitro culture in a cysteine-supplemented medium. *Theriogenology.* 2007;67:835-47.
38. Kobayashi M, Asakuma S, Fukui Y. Blastocyst production by in vitro maturation and development of porcine oocytes in defined media following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote.* 2007;15:93-102.
39. Nagai T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology.* 2001;55:1291-301.
40. Ka HH, Sawai K, Wang WH, Im KS, Niwa K. Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matures and penetrated in vitro. *Biol Reprod.* 1997;57:1478-83.
41. Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A, Modena S. Developmental capability of denuded bovine oocyte in co-culturesystem with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 30,50-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev.* 2005;71:389-97.
42. Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod.* 2000;63:805-10.
43. Kobayashi M, Lee ES, Fukui Y. Cysteamine or bmercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology.* 2006;65:1191-9.
44. Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol Reprod.* 2002;66:562-7.
45. Zhou P, Wu YG, Li Q, Lan GC, Wang G, Gao D, et al. The interactions between cysteamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes. *Reproduction.* 2008;135:605-11.
46. Rodriguez-Gonzalez E, Lopez-Bejar M, Mertens MJ, Paramio MT . Effects on in vitro embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2003;65:446-53.

**Recebido em: 16/01/12**

**Aceito em: 20/08/12**

## MATRIZ METALOPROTEINASES NA REPARAÇÃO CORNEAL. REVISÃO DE LITERATURA.

Cintia Sesso Perches<sup>1</sup>  
Cláudia Valéria Seullner Brandão<sup>2\*</sup>  
José Joaquim Tilton Ranzani<sup>2</sup>  
Noeme Sousa Rocha<sup>3</sup>  
Maria Guadalupe Sereno<sup>1</sup>  
Joice Furtado Fonzar<sup>1</sup>

### RESUMO

As Matriz Metaloproteinasas (MMPs) são enzimas proteolíticas que têm a função de manutenção e remodelamento da arquitetura tecidual. Elas atuam sobre componentes da matriz extracelular, secretam citocinas e moléculas da superfície ocular, e têm sido relacionadas a uma série de processos fisiológicos e doenças, como úlceras corneais, que estão entre as afecções de maior ocorrência na oftalmologia veterinária. Após lesão corneal, múltiplos sistemas são ativados, produzindo uma série de processos celulares complexos e coordenados que envolvem fatores de crescimento, citocinas, proteinases e seus inibidores, resultando na reparação da córnea. As principais proteinases presentes na córnea são as MMPs e as proteinases serinas. Um desequilíbrio entre proteinases e seus inibidores, em favor das proteinases, provoca uma degradação patológica do colágeno estromal e proteoglicanas, levando a uma ulceração corneal persistente ou ao “melting” corneal, podendo ocasionar a perda da visão do animal. O objetivo desta revisão é apresentar os principais estudos relacionados ao envolvimento das MMPs durante a reparação corneal e seus processos patológicos.

**Palavras-chave:** matriz metaloproteinasas, córnea, ceratite ulcerativa, reparação tecidual

### MATRIX METALLOPROTEINASES IN CORNEAL REPAIR. REVIEW

#### ABSTRACT

The Matrix Metalloproteinases (MMPs) are proteolytic enzymes that have the function of maintenance and remodeling of tissue architecture. They act on the extracellular matrix components, secrete cytokines and molecules of the ocular surface, and have been related to a variety of physiological processes and diseases, such as corneal ulcers, which are one of the most frequent diseases in veterinary ophthalmology. After corneal injury, multiple systems are activated, producing a serie of complex and coordinated cellular processes involving growth factors, cytokines, proteinases and their inhibitors, resulting in the repair of the cornea. The main proteinases present in the cornea are MMPs and serine proteinases. An imbalance between proteinases and their inhibitors in favor of the proteinases, cause pathologic degradation of stromal collagen and proteoglycans, leading to a persistent corneal ulceration

<sup>1</sup> Médica Veterinária Doutoranda em Cirurgia Veterinária pelo Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Distrito de Rubião Junior – s/n – Botucatu/ SP/ Brasil

<sup>2</sup> Médicos Veterinários Docentes do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Distrito de Rubião Junior – s/n – Botucatu/ SP/ Brasil

<sup>3</sup> Médica Veterinária Docente do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Distrito de Rubião Junior – s/n – Botucatu/ SP/ Brasil

\*Autor Correspondente: Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil. Distrito de Rubião Junior, s/n, 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: valeriasb@fmvz.unesp.br (C.V.S. Brandão)

or corneal melting, and may result in the loss of animal vision. The aim of this review is to present the main studies related to the involvement of MMPs during corneal repair and their pathological processes.

**Keywords:** matrix metalloproteinases, cornea, ulcerative keratitis, tissue repair

## METALOPROTEINASAS DE MATRIZ EN LA REPARACIÓN DE LA CORNEA. REVISIÓN DE LITERATURA.

### RESUMEN

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son un grupo de enzimas proteolíticas con la función de mantener y remodelar los tejidos. Estas actúan sobre componentes de la matriz extracelular, secretan citocinas y moléculas de la superficie ocular y han sido asociadas a una serie de procesos fisiológicos y enfermedades, por ejemplo las úlceras de córnea, mismas que se encuentran entre las afecciones oftalmológicas más comunes en la medicina veterinaria. Luego de una lesión en la córnea, varios sistemas se activan desencadenando una serie de procesos celulares complejos y coordinados que envuelven factores de crecimiento, citocinas, proteinasas y sus inhibidores, lo que trae como resultado la reparación corneal. Las principales proteinasas presentes en la córnea son las MMPs y las serinas proteinasas. Un desequilibrio entre las proteinasas y sus inhibidores, a favor de las primeras provoca la degradación patológica del colágeno y de los proteoglicanos del estroma llevando a una úlcera corneal persistente o a “melting” corneal, con la posible pérdida de la visión del animal. El objetivo de la presente revisión es exponer los principales estudios relacionados a las MMPs durante la reparación corneal y sus manifestaciones patológicas.

**Palabras clave:** metaloproteinasas de matriz, córnea, queratitis ulcerativa, reparación de tejidos.

### INTRODUÇÃO

A córnea é a estrutura anterior e transparente da túnica fibrosa do bulbo ocular, sendo responsável pela refração da luz, permitindo a sua entrada no olho, com qualidade e quantidade suficientes para que a imagem possa ser formada na retina. Devido à sua exposição constante ao meio ambiente, a córnea é muito suscetível às lesões, o que justifica o fato de úlcera corneal estar entre as doenças oculares mais comuns (1).

Após lesão corneal, múltiplos sistemas são ativados, produzindo uma série de processos celulares complexos e coordenados que resultam na sua completa reparação. Estes envolvem proteinasas e seus inibidores, fatores de crescimento e citocinas produzidos por células epiteliais, ceratócitos estromais, células inflamatórias e glândulas lacrimais (2). As principais proteinasas presentes na córnea são as matriz metaloproteinases (MMPs) e as proteinasas serinas (1).

As MMPs são uma família de enzimas proteolíticas que têm a função de manutenção e remodelamento da arquitetura tecidual (3).

Um desequilíbrio entre proteinasas e seus inibidores, em favor das proteinasas, provoca a degradação patológica do colágeno estromal e proteoglicanas, levando a uma ulceração corneal persistente ou ao “melting” corneal (2).

Assim, vários estudos sobre MMPs têm sido realizados com o intuito de esclarecer os processos fisiológicos que ocorrem durante a reparação celular, além de estudar as alterações ocorridas durante processos patológicos (2, 4).

## Reparação da córnea

A córnea é composta por cinco camadas: filme lacrimal pré-corneal, epitélio e sua membrana basal, estroma, membrana de Descemet e endotélio. O epitélio corneal é simples, escamoso e não queratinizado, de espessura variável (inferior a 1mm), com padrão básico de membrana basal, células epiteliais basais, células aladas e células superficiais escamosas. O epitélio corneal é renovado constantemente pela proliferação por mitose das células da camada basal (5, 6). O estroma representa 90% da espessura corneal (7) e consiste principalmente de fibrilas colágenas, ceratócitos, nervos e glicosaminoglicanas. As fibrilas colágenas estão dispostas em lamelas paralelas à superfície corneal, característica importante para a transparência corneal. Também são encontrados no estroma, colágeno tipo VI e XII, que não estão na forma de fibrilas, entretanto interagem com estas e são igualmente importantes fisiologicamente (1).

A camada epitelial apresenta grande capacidade de regeneração, assim após lesão, o epitélio normal da borda do defeito achata-se, retrai e fica espessado, perdendo seus hemidesmossomos que estavam ligados à membrana basal. Em seguida, as células entram em mitose e deslizam em direção ao centro da lesão, preenchendo o defeito (1). Dentro de 4 a 7 dias ou menos toda a córnea é reepitelizada (5, 6).

Defeitos estromais superficiais são preenchidos por deslizamento de células epiteliais que sofrem mitose. Em defeitos profundos, o epitélio rapidamente recobre a superfície, porém o preenchimento estromal requer síntese e reticulação de colágeno, síntese de proteoglicanas e remodelamento gradual da ferida (1). Cicatrização avascular ocorre em lesões estromais descomplicadas, enquanto a vascular ocorre em lesões infectadas e destrutivas (6).

Após ser lesionado, o epitélio pode sintetizar colágeno e estimular a síntese deste por fibroblastos e ceratócitos, além de secretar collagenases. A presença de collagenases e proteinases no processo de reparação tecidual pode influenciar negativamente a cicatrização. Outros fatores que também influenciam a reparação incluem os fatores peptídeo de crescimento, como fator de crescimento epidermal (EGF), fator beta transformador do crescimento (TGF $\beta$ ) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). O EGF aumenta a síntese protéica e mitose dos fibroblastos epiteliais e estromais, enquanto o PDGF estimula a produção de fibronectina, ácido hialurônico e collagenase, e o TGF $\beta$  estimula a síntese de matriz extracelular e quimiotaxia de células inflamatórias (1).

Para o sucesso dos procedimentos terapêuticos deve-se, primordialmente, realizar a identificação e a eliminação da causa, tendo como objetivo a restauração e a preservação da córnea. Entre os procedimentos clínicos adotados, encontram-se a terapia antibiótica, os analgésicos, os agentes lubrificantes, a atropina e as drogas antiproteases, como EDTA, acetilcisteína, soro autólogo e ilomostat (1, 8).

## Matriz Metaloproteinases

O primeiro relato sobre matriz metaloproteinases (MMPs) ocorreu em 1962, quando Jerome Gross e Charles Lapiere demonstraram a ação de uma enzima, que posteriormente foi denominada collagenase, na reabsorção de caudas de girinos. Desde então, uma série de estudos têm relacionado processos fisiológicos, como a reparação celular, e patológicos, como úlceras de córnea, às ações enzimáticas das MMPs (9).

O relato da presença de matriz metaloproteinases no olho ocorreu pouco tempo após a sua descoberta, e foi feito por Slansky, Freeman e Itoi (10), que demonstraram sua atividade proteolítica em córneas bovinas saudáveis e ulceradas. Desde então, crescentes estudos têm demonstrado o envolvimento de MMPs no bulbo ocular e em suas afecções (3).

A maioria das matriz metaloproteínases não são expressadas em níveis detectáveis em tecidos normais e saudáveis. Porém, níveis de MMPs podem ser observados em qualquer tecido inflamado e culturas celulares. Os tipos e quantidades expressadas dessas enzimas variam de acordo com as doenças, neoplasias, inflamações e tipos celulares, já que todo tecido possui matriz extracelular, que necessita das MMPs frente a um processo fisiológico ou patológico de remodelação tecidual (9).

Como regra geral, as matriz metaloproteínases não são sintetizadas até que seja necessário. Uma série de citocinas e fatores de crescimento podem induzir ou inibir a sua produção, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), fator beta transformador do crescimento (TGF- $\beta$ ), entre outros (3, 11).

Micro-organismos, células inflamatórias, células epiteliais corneais e fibroblastos ativos podem produzir enzimas proteolíticas. As produzidas pelos micro-organismos infecciosos são denominadas proteínases exógenas, enquanto as demais são denominadas proteínases endógenas. As enzimas produzidas por bactérias ou fungos podem agir na córnea lesionada de forma direta, ou indiretamente pela ativação de proteínases endógenas (2).

As proteínases são enzimas hidrolíticas e podem ser distribuídas em quatro classes baseadas no grupo catalítico do seu centro ativo; são elas: serina/treonina, cisteína, aspártico e metalo (9). As MMPs pertencem à classe metalo, dependem de zinco para a sua ação catalítica e são classificadas em cinco grupos: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromalisinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11), MMPs tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) e outros (MMP-7, MMP-12, MMP-20 e MMP-26) (Tabela 1) (9, 12, 13). Normalmente são secretadas como pró-enzimas e ativadas no meio extracelular, entretanto existem MMPs que integram membranas e agem na região pericelular (3).

As collagenases reconhecem colágeno tipo I, II e III; as gelatinases degradam colágeno tipo IV, V e VII, decorina, fibronectina e laminina; as estromalisinas e matrilisinas atuam sobre colágeno tipo IV, pró-colágeno, colágeno “*cross-link*”, fibronectina, laminina e ativam outras MMPs; e as MMPs tipo membrana estão envolvidas em atividades pericelulares (3, 13). Entretanto, pesquisas constantes têm demonstrado novas funções das MMPs e indicam uma grande capacidade de expansão na lista de potenciais alvos de suas ações (3).

Recentemente, Treumer et al. (14) descreveram, após estudo imuno-histoquímico, a presença de MMP-19 em células basais do epitélio após ceratites ulcerativas, porém sua exata função ainda não foi estabelecida na córnea.

Tabela 1. Principais matriz metaloproteínases encontradas na córnea.

Grupo	MMP	Nome enzimático
Collagenases	MMP-1	Colagenase intersticial
	MMP-8	Neutrófilo colagenase
	MMP-13	Colagenase-3
Gelatinases	MMP-2	Gelatinase A
	MMP-9	Gelatinase B
Estromalisinas	MMP-3	Estromalisina-1
	MMP-10	Estromalisina-2
	MMP-11	Estromalisina-3
MMPs tipo membrana	MMP-14	MT1-MMP
	MMP-16	MT3-MMP
	MMP-17	MT4-MMP
	MMP-24	MT5-MMP
	MMP-25	MT6-MMP
Outras	MMP-7	Matrilisina
	MMP-26	Matrilisina-2
	MMP-12	Macrófago metaloelastase

MMP – Matriz Metaloproteínase. Fonte: Brooks e Ollivier (12)

Os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) estão presentes no meio extracelular e têm a capacidade de ligarem-se ao sítio ativo das MMPs, inativando-as (15). Há pelo menos 4 TIMPs conhecidos, que têm, além da função de inibir a atividade das MMPs, um papel importante no crescimento celular, diferenciação e apoptose (3).

As proteinases serinas são outra classe de enzimas que também atuam na córnea. A neutrófilo elastase é a proteinase serina mais abundante na lágrima e é sintetizada por polimorfonucleares e macrófagos. Ela degrada colágeno tipo III e IV, laminina e fibronectina (12).

A atividade das MMPs é altamente controlada por sua transcrição, ativação da proenzima e inibição da enzima ativa por TIMPs. As MMPs podem ser ativadas por componentes não proteolíticos, proteinases serinas, MT-MMPs ou podem ser ativadas no meio intracelular (12).

As matriz metaloproteinases tipo membrana (MT-MMPs) estão associadas às membranas celulares e têm funções importantes na sinalização celular e proteólises pericelulares. A MT1-MMP (MMP14) é a melhor caracterizada, e é responsável pela ativação da MMP-2 pela sua interação com a TIMP-2, além de atividades proteolíticas pericelulares (16).

Diversos estudos em camundongos com genes inativados vêm demonstrando o envolvimento das MMPs no desenvolvimento de várias doenças. A inativação da gelatinase B (MMP-9) retardou a vascularização e ossificação das linhas de crescimento ósseo (17), além de diminuir a fertilidade (18). A ausência de MT1-MMP levou ao desenvolvimento progressivo de artrite e nanismo (19). Assim, os trabalhos com camundongos “*knockout*” provocaram leves alterações de fenótipos, sugerindo que há uma sobreposição de funções entre as MMPs (3).

As matriz metaloproteinases também têm sido associadas à progressão de neoplasias, favorecendo a invasão tecidual, neovascularização e metástases. Estudos imuno-histoquímicos têm correlacionado a alta expressão de MMPs com malignidade tumoral (3, 16).

### **Matriz metaloproteinases e reparação corneal**

O reparo da matriz extracelular do estroma requer um balanço coordenado de síntese, degradação e remodelação estromal. A degradação excessiva do tecido saudável é prevenida por inibidores naturais de proteinases presentes na córnea e no filme lacrimal; dentre eles encontram-se inibidor de proteinase- $\alpha$ 1, macroglobulina- $\alpha$ 2 e matriz metaloproteinases (MMPs) junto com inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). Um desequilíbrio entre proteinases e seus inibidores, em favor das proteinases, provoca degradação patológica do colágeno estromal e proteoglicanas, levando a uma ulceração corneal persistente ou o “melting” corneal (2).

A bactéria *Pseudomonas* produz dois tipos de MMPs, denominadas elastase e protease alcalina, que são responsáveis por ceratites ulcerativas agressivas (12).

As principais famílias enzimáticas presentes na córnea são as MMPs e as proteinases serinas. A proteinase serina mais abundante na lágrima humana, canina e equina é a neutrófilo elastase (NE), que é produzida por leucócitos polimorfonucleares e macrófagos. Ela é responsável pela degradação de colágeno tipo III e IV e por componentes da matriz extracelular, como laminina e fibronectina. As MMPs de maior importância na degradação e remodelação do colágeno estromal são as MMP-2 e MMP-9. Por imuno-histoquímica identificou-se as duas enzimas em córneas lesionadas, enquanto a MMP-2 também foi encontrada em córneas saudáveis de várias espécies, como humanos, cães, camundongos, ratos e cavalos (1).

A MMP-2 é produzida por ceratócitos e tem a função de manutenção da córnea saudável, sendo localmente ativada para degradar moléculas de colágeno danificadas,

enquanto a MMP-9 é produzida por células epiteliais e polimorfonucleares após lesões corneais (1). Este padrão foi comprovado em um estudo imuno-histoquímico em córneas equinas saudáveis, onde encontrou-se MMP-2 no epitélio corneal, principalmente na camada superficial, uma pequena quantidade no estroma, logo abaixo do epitélio, e no endotélio. Nas córneas lesionadas foi detectado MMP-2 e MMP-9 no epitélio, em toda a extensão do estroma e no endotélio corneal (20). MMP-2 e MMP-9 também foram observadas no epitélio e estroma anterior de córneas caninas com úlceras em “melting” e traumáticas (21). Em outro estudo, Chandler, Kusewitt e Colitz (22) encontraram essas enzimas no epitélio corneal de úlceras persistentes em cães. Também encontrou-se um aumento dessas enzimas na ceratopatia climática em gota em humanos (23).

Em ceratites ulcerativas de camundongos infectadas por herpesvirus, também foi notada a presença de aumento da quantidade das MMPs 2, 8 e 9 logo após a lesão e um aumento de TIMP-1 e TIMP-2 apenas após 7 dias da lesão, demonstrando um balanço entre as proteinases e seus inibidores durante a reparação corneal (24).

A gelatinase B (MMP-9) é a primeira MMP a ser sintetizada e secretada por células epiteliais basais após lesão corneal, sendo detectado um rápido aumento na sua expressão com apenas um dia após lesão e declínio após poucas semanas, enquanto a gelatinase A (MMP-2), a estromalisina e a colagenase são apresentadas normalmente no estroma corneal e aumentam gradualmente por vários meses, demonstrando o envolvimento na remodelação tecidual (3).

Sakimoto et al. (25) realizaram um estudo comparativo com córneas humanas ulceradas por trauma ou queimadura alcalina, observando a expressão de MMP-2 e MMP-9 ativos, além da presença de MT1-MMP, que é uma das responsáveis pela ativação de MMP-2, e concluíram que, nas córneas lesionadas, todas essas enzimas apresentam-se aumentadas quando comparadas às córneas intactas, demonstrando o envolvimento das gelatinases em doenças da córnea humana.

Em córneas saudáveis de ratos a colagenase III (MMP-13) não é expressada, porém, após apenas 6 horas decorrentes de uma lesão corneal já são detectados níveis de MMP-13 nas células basais do epitélio. Já MT1-MMP é expressada nos ceratócitos estromais tanto em córneas saudáveis de ratos quanto em lesionadas (26).

Segundo Reviglio et al. (27), córneas de ratos saudáveis tratadas com lágrimas artificiais, não expressam MMP-1 e MMP-8. Após a remoção experimental do epitélio corneal, essas enzimas são expressadas principalmente na camada epitelial, como resultado do processo de reparação tecidual normal. Entretanto, córneas, saudáveis ou ulceradas, tratadas com diclofenaco de sódio 0,1% ou ceterolac, apresentaram altos níveis de MMP-1 e MMP-8 no epitélio corneal e estroma. Uma das explicações para essa alta expressão de MMPs em córneas tratadas com anti-inflamatórios não esteroidais é o bloqueio de COX-1, que é uma enzima responsável por funções homeostáticas na córnea, como regulação de prostaglandinas que protegem o tecido de danos e aceleram a cicatrização.

Em córneas ulceradas em “melting” provenientes de pacientes com síndrome primária de Sjögren's, doença sistêmica auto-imune caracterizada pela destruição de glândulas lacrimais e salivares, observou-se um aumento intenso na expressão de MMP-1, 2, 7 e 9, e um aumento moderado de MMP-3 e 8 no epitélio. No estroma foram expressadas em maior quantidade as metaloproteinases 1, 2, 3, 8 e 9. Já no endotélio, houve a expressão apenas de MMP-9 de forma moderada, enquanto a das MMPs 1, 2, 3, 7 e 8 foi fraca (13). Chotikavanich et al. (28) também observaram um aumento de MMP-9 em filme lacrimal de pacientes com síndrome da disfunção lacrimal.

A neovascularização envolve o processo de invasão de células endoteliais, degradação da matriz extracelular e ativação de citocinas, e as MMPs desenvolvem papel importante tanto na angiogênese fisiológica quanto na patológica (3). Muitos fatores de crescimento que regulam a formação de novos capilares sanguíneos, também afetam a expressão de MMPs, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de

fibroblasto-2 (FGF-2), e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (29, 30). Em um estudo *in vitro* e *in vivo* com ratos, demonstrou-se a importância e interatividade entre MMP-9 e VEGF na formação de novos vasos sanguíneos (31). Enquanto, em outro trabalho, a MT1-MMP apresentou uma ação anti-angiogênica (32).

A MMP-2 também está envolvida na angiogênese, localizando-se na superfície de células endoteliais invasoras, em que a MT1-MMP provavelmente é o seu ativador proteolítico primário (33).

O filme lacrimal de animais com úlceras de córnea possui um nível elevado de proteinases quando comparado ao de animais saudáveis. Estudos analisaram a atividade proteolítica (MMP-2 e MMP-9) de amostras seriadas de filmes lacrimais pré-corneais equinos e chegaram à conclusão que as enzimas proteolíticas apresentam-se elevadas no início da lesão e declinam progressivamente com a reparação corneal. Nas úlceras em “melting” os níveis de metaloproteinases permaneceram elevados, levando a uma rápida progressão da úlcera (34). Portanto, o sucesso do tratamento de úlceras de córnea é um reflexo da atividade proteolítica presente no filme lacrimal pré-corneal (2). Aferições da atividade de MMP no filme lacrimal representam uma das formas de monitorar a progressão da reparação corneal em equinos com ceratite ulcerativa (34).

Alguns trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de se obter inibidores sintéticos de MMPs, já que os inibidores naturais (TIMPs) são farmacologicamente instáveis. A obtenção desses inibidores poderá ser utilizada no tratamento de diversas doenças, como neoplasias, metástases, esclerose múltipla, artrite reumatóide, doença de Alzheimer, falência cardíaca e úlceras de córnea (35).

Os inibidores sintéticos atuam sobre o centro ativo das matriz metaloproteinases e sobre a capacidade catalítica do zinco, inibindo a sua ação. Já foram descritos alguns grupos de inibidores sintéticos, como hidroxamato, que é pouco específico, carboxilato, thiolato, fosfonato e fosfinato, este último sendo efetivo contra as MMPs 2 e 8 (35).

O ilomostat é um ácido hidroxâmico, que possui a capacidade de inibir as MMPs durante o tratamento de ceratites ulcerativas com rápida degradação estromal. Ele é efetivo contra elastase produzida por *Pseudomonas*, MMP-1 e MMP-9. Esse inibidor sintético na concentração de 0,1% apresentou uma taxa de 98,9% de atividade anti-MMP *in vitro* (12).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As matriz metaloproteinases (MMPs) são enzimas proteolíticas com importantes atividades descritas na córnea, tais como envolvimento na síntese, degradação e remodelação estromal, e vascularização corneal; desenvolvem funções homeostáticas na córnea e apresentam grande expressão durante o processo de reparação celular. Existem diversos estudos sobre MMPs, porém ainda são necessárias mais pesquisas relacionando o seu aparecimento às diferentes causas de úlceras de córnea e aos processos de reparação fisiológicos, já que um desequilíbrio entre as MMPs e seus inibidores provoca ulcerações corneais persistentes.

## REFERÊNCIAS

1. Gilger BC, Bentley E, Ollivier FJ. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: Gelatt KN. Veterinary ophthalmology. 4th ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2007. p.690-752.
2. Ollivier FJ, Gilger BC, Barrie KP, Kallberg ME, Plummer CE, O'Reilly S, et al. Proteinases of the cornea and precocular tear film. Vet Ophthalmol. 2007;10:199-206.

3. Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res.* 2002;21:1-14.
4. Gan L, Hamberg-Nyström H, Fagerholm P, Setten GV. Cellular proliferation and leukocyte infiltration in the rabbit cornea after photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmol Scand.* 2001;79:488-92.
5. Gelatt KN. Manual de oftalmologia veterinária. Barueri: Manole; 2003.
6. Slatter D. Fundamentos de oftalmologia veterinária. 3ª ed. São Paulo: Roca; 2005.
7. Herrera D. Oftalmologia clínica em animais de companhia. São Paulo: MedVet; 2008.
8. Nasisse MP. Canine ulcerative keratitis. In: Glaze MB. The compendium collection: ophthalmology in small animal practice. 2ª ed. New Jersey: Veterinary Learning Systems; 1996. p.45-57.
9. Parks WC, Mecham RP. Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press; 1998.
10. Slansky HH, Freeman MI, Itoi M. Collagenolytic activity in bovine corneal epithelium. *Arch Ophthalmol.* 1968;80:496-8.
11. Gordon GM, Ledee DR, Feuer WJ, Fini ME. Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells. *J Cell Physiol.* 2009;221:402-11.
12. Brooks DE, Ollivier FJ. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004;34:611-22.
13. Brejchova K, Liskova P, Hrdlickova E, Filipec M, Jirsova K. Matrix metalloproteinases in recurrent corneal melting associated with primary Sjörgen's syndrome. *Mol Vis.* 2009;15:2364-72.
14. Treumer F, Flöhr C, Klettner A, Nölle B, Roider J. Expression of matrix metalloproteinase-19 in the human cornea. Wound healing in the MMP-19 knock-out mouse model. *Ophthalmologe.* 2010;107:647-53.
15. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477:267-83.
16. Fillmore HL, Vanmeter TE, Broaddus WC. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *J Neurooncol.* 2001;53:187-202.
17. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell.* 1998;93:411-22.
18. Dubois B, Arnold B, Opdenakker G. Gelatinase B deficiency impairs reproduction. *J Clin Invest.* 2000;106:627-8.

19. Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley JM, Twining SS, Diaz LA, et al. The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell*. 2000;102:647-55.
20. Ollivier F. Matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, connective tissue growth factor in the equine tear fluid: possible implications in corneal wound healing [tese]. Gainesville: Universidade da Florida; 2004.
21. Kallberg ME, Brooks DE, Ollivier FJ, Nelligan M, Lewis PA, Gelatt KN. Differences in location of matrix metalloproteinases 2 and 9 in normal and ulcerated canine corneas (abstract). *Vet Ophthalmol*. 2004;7:439.
22. Chandler HL, Kusewitt DF, Colitz CM. Enhanced protease production in refractory corneal ulcers (abstract). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:914.
23. Holopainen JM, Serra HM, Sánchez MC, Sorsa T, Zalentein WN, Barcelona PF, et al. Altered expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as possible contributors to corneal droplet formation in climatic droplet keratopathy. *Acta Ophthalmol*. 2011;89:569-74.
24. Yang Y, Bauer D, Wasmuth S, Steuhl K, Heiligenhaus A. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and 9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1 and 2) during the course of experimental necrotizing herpetic keratitis. *Exp Eye Res*. 2003;77:227-37.
25. Sakimoto T, Shoji J, Kanno H, Sawa M. Gelatinase expression in ocular surface disorders. *Jpn J Ophthalmol*. 2004;48:17-22.
26. Ye HQ, Maeda M, Yu FX, Azar DT. Differential expression of MT1-MMP (MMP-14) and collagenase III (MMP-13) genes in normal and wounded rat corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:2894-9.
27. Reviglio VE, Rana TS, Li QJ, Ashraf MF, Daly MK, O'Brien TP. Effects of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the expression of matrix metalloproteinases in the cornea. *J Cataract Refract Surg*. 2003;29:989-97.
28. Chotikavanich S, Paiva CS, Li DQ, Chen JJ, Bian F, Farley WJ, et al. Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:3203-9.
29. Mohan R, Sivak J, Ashton P, Russo LA, Pham BQ, Kasahara N, et al. Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *J Biol Chem*. 2000;275:10405-10412.
30. Raza SL, Cornelius LA. Matrix metalloproteinases: pro and anti-angiogenic activities. *J Invest Dermatol*. 2000;5:47-54.
31. Ebrahim Q, Chaurasia SS, VasANJI A, Qi JH, Klenotic PA, Cutler A, et al. Cross-talk between vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in the induction of neovascularization in vivo. *Am J Pathol*. 2010;176:496-503.

32. Azar DT, Casanova FH, Mimura T, Jain S, Chang J. Effect of MT1-MMP deficiency and overexpression in corneal keratocytes on vascular endothelial cell migration and proliferation. *Curr Eye Res.* 2008;33:954-62.
33. Haas TL, Davis SJ, Madri JA. Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998;273:3604-10.
34. Ollivier FJ, Brooks DE, Van Setten GB, Schultz GS, Gelatt KN, Stevens GR, et al. Profiles of matrix metalloproteinase activity in equine tear fluid during corneal healing in 10 horses with ulcerative keratitis. *Vet Ophthalmol.* 2004;7:397-405.
35. Bianchini G, Aschi M, Cavicchio G, Crucianelli M, Preziuso S, Gallina C, et al. Design, modelling, synthesis and biological evaluation of peptidomimetic phosphinates as inhibitors of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-8. *Bioorg Med Chem.* 2005;13:4740-9.

**Recebido em: 13/09/11**

**Aceito em: 13/09/12**

## A PRODUÇÃO DE LEITE ORGÂNICO E ASPECTOS DE SEGURANÇA ALIMENTAR

Mariana Cassins Galdino<sup>1</sup>  
Paulo Francisco Domingues<sup>2</sup>  
Bruna Sanches Lapenna<sup>3</sup>

### RESUMO

A produção orgânica de alimentos, entre eles o leite, deve ser harmoniosa com o ambiente e a saúde humana, e a sustentabilidade dessa produção deve estar atrelada à higiene e à segurança alimentar. Do ponto de vista sanitário, os aspectos desfavoráveis do leite orgânico podem ser a maior prevalência de mastite subclínica, a maior CCS, resíduos de antimicrobianos e outras substâncias nocivas e a presença de micotoxinas no alimento dos animais. Aspectos que podem ser positivos são a maior sensibilidade aos antimicrobianos; menor prevalência de mastite clínica e níveis inferiores de nitratos e nitritos no leite. No Brasil, tanto a produção de leite quanto o controle de qualidade realizado pelo governo, e a certificação dos orgânicos pelas agências, devem ser aprimorados para maior segurança alimentar. As fragilidades na manutenção da sanidade do rebanho orgânico poderiam ser minimizadas com práticas de higiene mais rigorosas e difusão da medicina veterinária complementar, como a homeopatia, a acupuntura e a fitoterapia.

**Palavras-chave:** leite, orgânico, produção leiteira, segurança alimentar, mastite.

### THE PRODUCTION OF ORGANIC MILK AND FOOD SECURITY ASPECTS

#### ABSTRACT

The organic food production, like organic milk, is harmonious with the environment and human health. The advance in producing with sustainability needs hygiene and food security. From the point of view of health, the negative aspects of organic milk can be the superior prevalence of subclinical mastitis, superior SCC, antimicrobial and other substances residues in milk and micotoxin in food animal. The positives aspects can be the superior antimicrobial sensibility, inferior prevalence of clinical mastitis and inferior nitrate and nitrite levels in milk. The milk production, the government control of the milk quality and the certification of the agencies must be improve in Brazil for the satisfactory food security. The difficulty in maintaining the health of the herd could be minimized with stricter hygiene and dissemination of complementary veterinary medicine, like acupuncture, homeopathy and herbal medicine.

**Keywords:** milk, organic, dairy, food security, mastitis.

<sup>1</sup> Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista - UNESP – Botucatu, SP.

<sup>2</sup> Professor do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista - UNESP – Botucatu, SP.

<sup>3</sup> Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista - UNESP – Botucatu, SP.

Correspondência: Paulo Francisco Domingues, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – Universidade Estadual Paulista - UNESP – CEP 18618-970 - Botucatu, SP. domingues@fmvz.unesp.br

## LA PRODUCCIÓN DE LECHE ORGÁNICA Y ASPECTOS DE SEGURIDAD ALIMENTICIA

### RESUMEN

La producción de alimentos orgánicos, como la leche, debe ser armoniosa con el medio ambiente y la salud humana. Al mismo tiempo, la sustentabilidad de dicha producción debe estar ligada a la higiene y a la inocuidad de los alimentos. Desde el punto de vista sanitario, los aspectos desfavorables de la leche orgánica puede ser la mastitis subclínica, el número alto de células somáticas, la presencia de residuos de antibióticos y otras sustancias nocivas en la leche, así como de micotoxinas en el alimento del rebaño. Las características positivas son una mayor sensibilidad a los antimicrobianos, menos prevalencia de mastitis clínica y disminución de los niveles de nitratos y nitritos en la leche. En Brasil, la producción de leche, el control gubernamental de la calidad de la leche y la certificación de las agencias tienen que mejorar para aumentar la seguridad alimenticia. Las deficiencias de las medidas sanitarias en el rebaño orgánico pueden ser minimizadas con prácticas más estrictas de higiene y la difusión de técnicas terapéuticas complementarias en la medicina veterinaria como la acupuntura, la homeopatía y la medicina herbolaria.

**Palabras clave:** leche, orgánico, producción de leche, inocuidad de los alimentos, mastitis.

### INTRODUÇÃO

O aquecimento global é o tema mais discutido pelas autoridades ambientais e seu impacto pode alterar drasticamente a vida dos seres humanos. Pessoas do mundo todo se preocupam hoje com as mudanças climáticas e outros impactos causados pelo homem devido sua grande intervenção no planeta. Uma avaliação internacional sobre o clima indicou que os impactos do aquecimento global causados pelos humanos tendem a ser cada vez piores (1). De acordo com o Centro Nacional de Pesquisas Atmosféricas, mesmo com a redução de gases poluentes, haverá um acréscimo de 320% do nível do mar até o final do século 21(2). Assim, surge mundialmente um grupo da população preocupado em ter um estilo de vida que não agrida a natureza, inclusive buscando o consumo de alimentos orgânicos. As mesmas pessoas estão, porém, preocupadas também com a segurança que o alimento lhes oferece.

Entre outras modificações na vida humana, a produção de alimentos é um dos aspectos que foi extremamente alterado, quer seja pela maior demanda pelo aumento da população mundial ou pela entrada de grandes indústrias nesse setor. A chamada “Revolução Verde” disseminou as novas técnicas agrícolas, mais intensivas, nas décadas de 60 e 70, e possibilitou o aumento da produção agrícola. Essa prática, no entanto, é contrária ao desenvolvimento sustentável, pois torna a produção dependente de insumos externos (3). No caso da produção leiteira de larga escala, esse uso é traduzido em ração, medicamentos e fertilizantes, entre outros. Uma fração considerável da produção mundial de leite é proveniente de fazendas grandes e com alta tecnificação. Porém, a maior parte da produção leiteira do nosso país é proveniente de pequenas propriedades rurais, com pouca tecnologia e muitas vezes de agricultura familiar.

A produção orgânica de alimentos, entre eles o leite, com características semelhantes à época anterior à “Revolução Verde”, tem menor uso de insumos e estratégias de controle de doenças diferenciadas, somando o conhecimento tradicional a outras tecnologias que não agridem a saúde humana. A produção orgânica busca ainda o equilíbrio com o ambiente, de modo que seu impacto sobre o meio seja o menor possível para evitar o incremento de efeitos como o aquecimento global. Esses aspectos fazem com que a produção orgânica de alimentos se enquadre nos quesitos de sustentabilidade.

O sistema de produção orgânico (SO), quando inova a produção leiteira em uma propriedade rural, deve manter os rigorosos padrões de qualidade impostos pelas instituições que controlam a segurança alimentar. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), uma das finalidades do SO é a oferta de produtos saudáveis (4). A relação entre a produção orgânica de leite e a segurança alimentar será abordada neste texto.

## REVISÃO DE LITERATURA

A produção de leite orgânico (LO) se enquadra dentro da Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica. De acordo com a lei, considera-se SO aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos. É ainda necessário o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais e a minimização da dependência de energia não-renovável. A lei recomenda que sejam empregados métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, e que seja feita a proteção do ambiente (4). Desta maneira, o LO deve ser uma alternativa positiva para a saúde da população, para o meio ambiente e para a economia.

Apesar do termo “orgânico” ser usado de forma generalizada para mencionar o tipo de produção descrito anteriormente, existe outras denominações usadas pelos produtores, com algumas diferenças históricas e variadas abordagens do sistema agrícola, mas sempre com os conceitos de sustentabilidade. Entre eles estão os sistemas de produção ecológico, agroecológico, natural, biodinâmico, permacultura e natural (4). Esta revisão de literatura, assim como as pesquisas, aborda todos esses tipos de sistema como orgânicos.

Muitos produtores rurais fazem a conversão do sistema convencional de produção (SC) de leite para o orgânico visando maior lucro, uma vez que o valor agregado do produto orgânico é superior ao convencional (5). Mas a conversão do sistema visando isoladamente o lucro não é condizente com a totalidade do conceito de “orgânico” e pode resultar em falhas na produção de boa qualidade. Ao mesmo tempo, o lucro pode representar ganho sócio-econômico para inúmeras famílias rurais que, muitas vezes, optam pela produção orgânica pela intenção de realizar uma agricultura sustentável e que preserve os recursos naturais de sua propriedade e arredores.

Nesta revisão de literatura, é importante levar em consideração que o gado orgânico de outros países possui características que o diferem do rebanho nacional, por exemplo, na alimentação, comumente mais rica em forragens no Brasil. Diferenças existem ainda no país, com regiões diferentes e regras distintas aplicadas pelas várias certificadoras.

Porém, apesar das diferenças, é fato que os principais objetivos do SO, independente do país, são o emprego da maior parte possível de recursos naturais e a restrição ao uso de fertilizantes químicos, pesticidas, antimicrobianos e outros produtos sintéticos (6, 7).

A classificação do leite como orgânico não é fiscalizada pelos órgãos de controle estaduais do Brasil e, portanto, passa a ter valor de mercado a partir do momento em que é certificado. Existem diferentes tipos de certificadoras oficiais, formadas por grupos de produtores ou empresariais. Representam instituições desses tipos, respectivamente, a AGRECO – Associação de Agricultores Ecológicos das Encostas da Serra Geral (8) e o IBD – Instituto Biodinâmico Certificações (9), que possui diretriz para o padrão de qualidade abrangente e com regras semelhantes aquelas de outras associações.

As diretrizes do IBD são baseadas nas normas da IFOAM (Federação Internacional de Movimentos da Agricultura Orgânica) e no regulamento nº 844/2007 do Mercado Comum Europeu. Entre as recomendações para a criação animal orgânica indica-se a adequação da raça priorizando o critério de resistência; alimentação de alto valor biológico e manejo que garanta bem estar animal. Caso seja necessária intervenção medicamentosa, a recomendação é

que se privilegiem medicamentos naturais – fitoterápicos, homeopáticos, etc. - em detrimento dos sintéticos. Esses podem ser utilizados, quando necessário, sob a orientação do médico veterinário. Nesses casos, o período de carência do medicamento deve ser o dobro daquele legalmente estabelecido e cada animal pode ser medicado somente duas vezes na vida. Essas se constituem em diferenças fundamentais deste sistema, no que diz respeito ao manejo e grande responsabilidade do produtor rural (9). A restrição ao uso de medicamentos sintéticos, como os antimicrobianos, é um fator que dificulta a adequação do produtor de leite ao SO.

A demanda por alimentos orgânicos tem crescido marcadamente nos últimos cinco a dez anos, com consequente aumento desse nicho do mercado. Além da preocupação ambiental, é um reflexo da preocupação do consumidor com a segurança dos produtos provenientes de fazendas com sistemas intensivos. O *Select Committe on European Communities* concluiu que a saúde é o fator primordial para a população se sujeite a pagar mais caro pelo alimento orgânico. A visão de que o orgânico é mais saudável que o convencional, baseia-se na percepção de qualidades sensoriais superiores, baixos níveis de pesticidas e adubos sintéticos, além de altos níveis de nutrientes e fitoquímicos protetores (10).

Atualmente estão sendo desenvolvidos testes para diferenciar o LO do leite convencional (LC), que somados à documentação, atestam a origem do leite para a proteção do consumidor. Alguns dos elementos usados experimentalmente na Alemanha, com sucesso nesta distinção, foram o ácido alfa-linoleico e isótopos de carbono estável, sendo o primeiro maior e o segundo menor no leite orgânico (11).

O avanço em produzir de forma sustentável deve estar atrelado à higiene e à segurança alimentar. Por isso, a produção ecológica de leite não pode significar um passo atrás no que diz respeito à saúde pública, uma vez que o produto pode levar o ser humano à ingestão de substâncias de origem extrínseca e potencialmente tóxicas. São ameaças à segurança do leite as toxinas de plantas tóxicas, resíduos de pesticidas, herbicidas e antimicrobianos ou a contaminação por microrganismos e seus subprodutos nocivos (12).

A segurança alimentar pode ter dois diferentes significados. O conceito consagrado pela medicina veterinária é de higiene e inocuidade, atestando a ausência de microrganismos e produtos prejudiciais à saúde humana. Outro conceito diz respeito à qualidade nutricional do alimento e a uma alimentação que promova uma vida saudável, utilizado, por exemplo, pelo Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional, do Governo Federal (13). Embora diversos estudos sobre o LO tratem das qualidades nutricionais do produto, o primeiro conceito abordado é essencial para um leite com qualidade adequada. A qualidade do alimento, incluindo sua segurança, dentro do SO e de seus subprodutos, é uma área que recebe muita atenção no debate das diferenças entre os alimentos produzidos orgânica ou convencionalmente (14).

Diversos trabalhos citados nesta revisão compararam a qualidade e segurança do LC ao LO, sendo os aspectos mais abordados: mastite avaliada por meio da contagem de células somáticas e cultivo microbiológico; resíduos de antimicrobianos; presença de micotoxinas; níveis de nitratos e nitritos e avaliação de manejo e higiene em propriedades rurais orgânicas.

Estudos mostram que propriedades orgânicas apresentam menor intervenção veterinária e casos de mastites (6, 15). Porém, há evidências de que a mastite subclínica com a consequente alta contagem de células somáticas (CCS) no leite seja um problema frequente em SO (16-18). As consequências da mastite subclínica em SO podem ser mais importantes que em SC pelo fato do produtor evitar o uso de antimicrobianos, uma vez que esse deve ter uso restrito e considerar um período de carência maior (19). Assim, é possível que muitas vezes ocorra a infecção crônica da glândula mamária ou tratamento tardio em relação ao início da infecção (20).

A idade das vacas em SO tende a ser maior que em SC, e como o avanço da idade leva a maior prevalência de mastite subclínica, há incremento na CCS (6, 21, 22). Por outro lado, a

produção de leite, menor em SO (21), aumenta a partir da 6ª lactação (6). Tendo as propriedades orgânicas um descarte mais tardio dos animais e sabendo-se da maior predisposição dos mais velhos em apresentarem problemas sanitários, como infecções, é imprescindível que o manejo seja cuidadoso para manter a sanidade do rebanho.

O SO também foi comparado por Roesch, Doherr e Blum (17) ao sistema integrado, um SC, porém, com uso de insumos e contaminantes minimizado pelo aproveitamento de recursos naturais. Os autores não observaram diferença significativa na CCS de ambos, apesar do SO ter menor controle da mastite subclínica, o que pode ser observado por diferença significativa na frequência de realização do CMT e desinfecção dos tetos após a ordenha, menores em SO.

Trabalhos realizados na Noruega, país que utiliza antibioticoterapia criteriosamente para tratar vacas secas, encontraram CCS pouco superior, significativamente, em SO (6, 23), especialmente a partir da sexta lactação (6). Os produtores leiteiros noruegueses que converteram seus rebanhos para orgânicos, mantendo os animais da raça Holandesa, relatam que tiveram um incremento na CCS e diminuição da produção (23).

A escolha do produtor pelo animal de genética mais adequada ao SO é essencial para a sustentabilidade da produção, além de favorecer a sanidade dos animais e a segurança alimentar. Portanto, para a formação das raças leiteiras destinadas ao SO deve ser levada em consideração a diversidade genética, a escolha de raças, a possibilidade de integração com o sistema produtivo e a consideração pela tradição de raças locais. É ainda importante considerar que, quando as medicações sintéticas são menos disponíveis, a seleção deve melhorar a resistência genética a doenças e parasitas (22). O valor individual da CCS também deve ser levado em consideração na seleção genética para melhorar a qualidade do leite orgânico, de acordo com trabalho que encontrou maior herdabilidade para essa característica em rebanhos orgânicos que nos convencionais (23).

Mais um fator que interfere significativamente na qualidade do leite é a higiene das vacas em lactação. Howell et al. (24) apontaram que a limpeza das vacas pode ser um fator relacionado ao bem estar animal, indispensável no SO. Ellis et al. (25) compararam dados de sete SO, em que os animais tinham maior acesso ao pasto, e sete SC, em que animais ficavam predominantemente estabulados, e observaram que os animais de manejo orgânico são, em média, mais limpos no Reino Unido. Ao mesmo tempo, o escore de limpeza do úbere teve uma correlação positiva com a incidência de mastite subclínica neste tipo de propriedade, isto é, quanto mais sujidades no úbere, maior a incidência de mastite. Apesar disso, a incidência de mastite subclínica foi igual nos dois tipos de sistema, e de mastite clínica, significativamente inferior no SO. Como o estudo encontrou uma forte correlação entre escore de limpeza do úbere em SO e a prevalência de mastite, comparado ao SC, recomenda-se que especialmente na ausência do uso de antimicrobianos, as vacas devem ser mantidas limpas como estratégia de controle da mastite subclínica.

Os trabalhos indicam que em grande parte das propriedades orgânicas, onde a prática de desinfecção dos tetos é menos comum e o uso de antimicrobianos deve ser banido, não há diferenças marcantes na ocorrência de mastites infecciosas (17). A situação é oposta em outras localidades, que tendem a ter LO mais contaminado que LC (26).

Com a preocupação de garantir a segurança alimentar, estudos avaliaram os microrganismos presentes no LO e os efeitos do uso restrito de antimicrobianos nas propriedades sobre as populações de bactérias. A mastite foi avaliada por cultivo microbiológico do leite de propriedades dinamarquesas e o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* foram os principais agentes encontrados nos casos subclínicos, o que coincide com dados de propriedades convencionais (15). Diferentemente, Pol e Ruegg (26) encontraram maior prevalência de bactérias no úbere de vacas manejadas organicamente, principalmente para *Streptococcus agalactiae*.

Em trabalho na Suíça, foram cultivadas amostras de leite com reação positiva ao teste CMT, e a diferença no crescimento de bactérias foi mínima, exceto por maior crescimento de *Streptococcus* spp. (exceto *S. agalactiae*) no LO e maior de *Staphylococcus* coagulase negativo (CNS) em LC, o que não está elucidado até o momento. *S. aureus*, de extrema importância na mastite contagiosa e saúde pública, foi encontrado em 25% do LO analisado, número menor que o descrito para o LC daquele país, de 39%, apesar dos animais criados convencionalmente receberem mais frequentemente antimicrobianos e antissépticos na higiene de ordenha (17).

Mais um dado sobre a microbiologia do LO e LC foi desenvolvido por Coorevits et al. (27), que observaram maior ocorrência de microrganismos termotolerantes no LC comparado ao LO, de 41% e 26% das amostras, respectivamente. Já a presença de *Bacillus cereus* foi significativamente maior em LO. As razões para as diferenças necessitam ser estudadas, mas podem estar relacionadas ao diferente manejo e alimentação.

Embora haja maior CCS em certos países, o leite orgânico parece estar contaminado com microrganismos menos resistentes a antimicrobianos comuns, o que representa uma vantagem à saúde pública. De acordo com a FAO (28), o largo emprego de antimicrobianos na produção animal contribui potencialmente para o desenvolvimento da resistência bacteriana.

De fato, a resistência bacteriana é um dos problemas modernos da medicina, que envolve a área veterinária e a produção animal. Por isso as aplicações de antimicrobianos devem ser avaliadas e selecionadas, a fim de manter os fármacos efetivos. Além de proporcionar a resistência, os resíduos de antimicrobianos no leite também podem provocar alergias graves e ter um efeito adverso na microbiota intestinal humana, causando prejuízo a sua ação protetora local (29). Como alerta para o risco à saúde humana, a positividade para resíduos de antimicrobianos teve índices de até 60% em amostras de leite de animais com mastite tratados por via sistêmica, após o período de carência (30).

A mastite, infecção mais comum no gado leiteiro (26, 31), é a causa mais frequente do uso de antimicrobianos nos rebanhos e teve seus agentes causadores mais comuns estudados em diversos trabalhos. Há uma forte relação entre a taxa de desenvolvimento de resistência antimicrobiana com a quantidade desses fármacos utilizados. Segundo Tikofsky et al. (32), se o uso de antimicrobianos é a maior pressão de seleção que leva à resistência a antimicrobianos, a redução do uso desses fármacos leva ao decréscimo de resistência. Os autores analisaram 113 cepas de *S. aureus* isoladas de LO e 117 de LC, com distribuição geográfica e tamanhos de fazendas semelhantes. Distintos antimicrobianos foram testados e encontraram-se sensibilidades significativamente maiores dos isolamentos de SO comparados aos isolamentos de SC, para a ampicilina, penicilina e tetraciclina. Além disso, quando foram comparados os diâmetros médios dos isolamentos dos dois tipos de rebanho, as zonas de inibição para *Staphylococcus* de SC foram menores ( $p \leq 0,05$ ) para seis dos nove antimicrobianos testados (32). A maior sensibilidade de CNS em SO também foi demonstrada por Bombik et al. (33). Entre outros antimicrobianos, os CNS eram significativamente mais sensíveis, principalmente à novobiocina. O motivo pela maior colonização de bactérias sensíveis a esse fármaco em propriedades orgânicas pode ter-se dado em decorrência do manejo dos animais, que ficam menos estabulados e têm menor contato com microrganismos do ambiente, onde se encontram os CNS resistentes a novobiocina.

Em outro estudo no mesmo país, Estados Unidos (EUA), de 912 isolamentos de SC e 304 de SO, os testes com antimicrobianos tiveram resultados semelhantes entre os tipos de propriedades e apenas a tetraciclina foi apontada como antimicrobiano de maior sensibilidade em microrganismos de rebanhos orgânicos (34).

Classificações diferentes para as propriedades rurais foram realizadas em um trabalho para comparar a pressão de seleção dos antimicrobianos sobre as populações de bactérias: um grupo utilizava largamente os antimicrobianos, outro utilizava seletivamente e o terceiro tinha

manejo orgânico e utilizava raramente ou nunca. A sensibilidade frente à pirlimicina diminuiu com a maior utilização desse antimicrobiano, para a maioria dos patógenos estudados, entre eles o *S. aureus*, com 76% de sensibilidade em isolamentos dos grupos de SC e 94% de SO (26). Por este estudo pode-se considerar que o uso de antimicrobianos, mesmo controladamente, pode induzir à resistência bacteriana.

Sato et al. (35) compararam a sensibilidade a antimicrobianos de isolamentos de *S. aureus* em tanques de LO e LC de dois países distantes geograficamente e que instituem práticas diferenciadas no manejo animal. Diferenças significativas entre LO e LC foram encontradas apenas para a ciprofloxacina nos EUA e avilamicina na Dinamarca. Entre os dois países, nove dos dez antimicrobianos testados em ambos tiveram diferenças significativas de sensibilidade. Nos EUA, onde os fármacos são empregados na secagem da vaca em 77% das fazendas (32), há maior probabilidade de haver a sensibilidade reduzida em oito dos antimicrobianos testados. O estudo reforça a necessidade de estudos em cada país sobre a sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos (35).

No Brasil, a qualidade do LO deve ser igual a do LC, instituída pela Instrução Normativa 51 do MAPA, em vista da igual obrigatoriedade de inspeção estadual ou federal dos laticínios. A IN impõe limites à CCS, contagem bacteriana total, ausência de resíduos de antimicrobianos e resfriamento do leite (36). Estudo de Ribeiro et al. (5) analisou o leite de 156 animais de quatro propriedades orgânicas no interior do estado de São Paulo e foram isolados os agentes mais comuns de mastite contagiosa. No entanto, diferente dos SO anteriormente citadas, foi encontrada resistência múltipla frente aos antimicrobianos mais indicados, o que pode ser decorrente das propriedades serem recentemente moduladas como orgânicas, mantendo os efeitos indesejáveis da terapia antimicrobiana incorreta de mastites manejadas convencionalmente (5). No mesmo trabalho há relato da presença de antimicrobianos em duas amostras de leite, provenientes de duas propriedades (5). Outra autora, que desenvolveu pesquisa na mesma região, detectou a presença de resíduos de pesticidas organofosforados maior no LO que no LC. CCS e teor de acidez também tiveram valores insatisfatórios no leite orgânico (37). Além de estarem em desacordo com a IN 51, estes resultados são extremamente alarmantes para a saúde pública e uma ameaça aos consumidores de LO, que compram um produto diferenciado, por ser supostamente mais seguro e saudável.

Ainda no âmbito da microbiologia, foi sugerido que as aplicações intensas de esterco e reduzidas de fungicidas e antimicrobianos poderiam resultar em maior contaminação do alimento orgânico por microrganismos e seus subprodutos (10). No entanto, foram relatados achados de presença superior de bactérias no LO, com exceção de coliformes fecais (26), assim como em trabalhos anteriormente citados, em que não há aumento de bactérias ambientais no leite, e sim de bactérias comuns na mastite contagiosa. Adicionalmente, foi demonstrada menor resistência frente aos antimicrobianos para patógenos fecais isolados do ambiente de propriedades leiteiras orgânicas quando comparadas às convencionais (38). Como uma forma de controle à qualidade do alimento orgânico, certificadoras estabelecem que o uso do esterco, deve ser realizado após o processo de compostagem, que elimina microrganismos potencialmente nocivos aos humanos (14).

Um dado que merece atenção na segurança do LO, foi a detecção de micotoxinas no alimento do gado, que por ser de origem orgânica, não deve conter substâncias fungicidas. Ghidini et al. (7) encontraram concentrações de aflatoxina maiores em amostras de LO comparado ao LC. Os dois tipos de leite continham amostras com toxina em limite superior ao estabelecido legalmente na Itália, mas o pior resultado estava nas amostras de LO, com quase metade das amostras nessa situação.

Em contrapartida, uma vantagem dos produtos orgânicos, sob o ponto de vista sanitário, parece ser a menor concentração de nitratos e nitritos. Proibidas pelo RIISPOA (39), essas moléculas são oriundas da adubação do solo por nitrogênio sintético ou outras fontes e podem

causar diversos danos à saúde humana, inclusive o câncer, disfunções hormonais e morte súbita em crianças. Inúmeros estudos mostram as concentrações de nitratos e nitritos menores em alimentos orgânicos comparados aos convencionais, principalmente em grãos, como o milho usado na alimentação de vacas leiteiras (10, 14). Outros estudos apontam níveis de nitratos altos inclusive em produtos orgânicos (14), como o realizado com leite de fazendas do estado do Rio Grande do Sul. Santos et al. (40) encontraram os mesmos níveis de nitratos e nitritos no leite de SO e SC, ainda que o trabalho não relatasse há quanto tempo as propriedades eram certificadas.

Outras pesquisas foram dedicadas a comparar resíduos de produtos químicos sintéticos de alimentos provenientes de sistemas convencionais e orgânicos. Contaminantes de pesticidas e metais pesados foram mensurados em fazendas da Itália e encontrava-se em quantidades, sem diferença significativa, em alimentos dos dois tipos de sistemas (7).

O manejo em SO foi avaliado por vários autores dos EUA e Europa e um aspecto de consenso é que a maior diferença quando comparado ao SC é que possui menor quantidade de concentrado para alimentação dos animais (6). Pelo mesmo motivo, em geral a produção de leite é diminuída, uma vez que as vacas leiteiras foram selecionadas nesses países para serem nutridas com alto valor energético. Em compensação, as doenças devem ocorrer em menor frequência, possivelmente pelo melhor equilíbrio metabólico dos animais. Todos os produtores rurais entrevistados por Rozzi, Miglior e Hand (22) reconheceram que depois de terem convertido o sistema para orgânico, a incidência de problemas de saúde diminuiu e casos de mastite aguda quase desapareceram.

Foi criada entre os países da União Européia, em 2003, uma comissão denominada “Sustaining Animal Health and Food Safety in Organic Farming” – SAFO, com o objetivo de melhorar a saúde animal e segurança alimentar em propriedades rurais orgânicas. A comissão, que realizou cinco encontros até o término programado de seu trabalho, em 2006, surgiu de uma iniciativa de políticos, produtores, pesquisadores e consumidores. Segundo Vaarst, Padel e Rymer (41), o reconhecimento da diversidade entre países e suas condições para a produção orgânica são a base para discussões sobre a segurança alimentar dos produtos e um alicerce para recomendações que gerarão o desenvolvimento das propriedades orgânicas. Ao mesmo tempo, Bourn e Prescott (14) apontam que claramente as agências certificadoras de orgânicos precisam de constante revisão em suas normas para compostagem e outras, a fim de melhorar a segurança alimentar.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O LO é derivado de produção favorável ao meio ambiente e ao consumidor, desde que sejam seguidos os conceitos definidos pelas leis vigentes e cumpridos os parâmetros legais para a qualidade do leite. É fundamental ressaltar que grande parte dos estudos que mostram diferenças significativas entre a qualidade do LO e LC utiliza SO consolidados há pelo menos três anos, e que existem grandes diferenças regionais na produção e qualidade do LO.

Do ponto de vista sanitário, os aspectos desfavoráveis em SO podem ser a maior prevalência de mastite subclínica, pelo uso restrito de antimicrobianos, higiene inadequada e outros; a maior CCS do leite; resíduos de antimicrobianos e outras substâncias nocivas no leite – nos estudos no estado de São Paulo (SP), Brasil – e a presença de micotoxinas no alimento dos animais. Aspectos que podem ser positivos no SO são a maior susceptibilidade aos antimicrobianos; menor prevalência de mastite clínica, possivelmente pelo equilíbrio metabólico dos animais; menor prevalência de patógenos ambientais no leite; e a menor presença de nitratos e nitritos no leite.

No Brasil, o controle de qualidade do LO, realizado no âmbito geral pelo governo e no que diz respeito às características próprias dos orgânicos pelas certificadoras, deve ser aprimorado para que o produto realmente atenda aos padrões estabelecidos para os orgânicos,

sem dar margem para os produtores que estão em desacordo com as regras ambientais e de segurança alimentar. Atualmente, o consumo do LO em SP, não garante maior segurança alimentar, comparado ao convencional, e pode ser nocivo. Por outro lado, pesquisadores e produtores europeus demonstraram grandes esforços em melhorar a produção e segurança desse alimento, especialmente com a SAFO.

O SO ainda tem fragilidades na manutenção da sanidade do animal, o que poderia ser minimizado com práticas de higiene mais rigorosas e maior difusão da medicina veterinária complementar, como a homeopatia, a acupuntura e a fitoterapia. Além disso, devem ser realizadas novas pesquisas sobre a produção de LO e controle de doenças, com o incentivo aos profissionais envolvidos na área, para que o LO tenha segurança alimentar e atenda à demanda por alta qualidade.

## REFERÊNCIAS

1. Kerr A. Global warming is changing the word. *Science*. 2007;316:5822-188.
2. Meehl GA, Washington WM, Collins WD, Hu AA, Buja LE, Strand LG, et al. How much more global warming and sea level rise? *Science*. 2005;307:5716-69.
3. Santos DMM. Revolução verde [Internet]. Jaboticabal; 2009 [acesso em 2009 Mar 3]. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/deptos/biologia/durvalina>
4. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 10.831, de 23 dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. [Internet Brasília; 2003 [acesso em 2003 Dec 23]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>
5. Ribeiro MG, Geraldo JS, Langoni H, Lara GHB, Siqueira AK, Salterno T, et al. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite produzido no sistema orgânico. *Pesqui Vet Bras*. 2009;29:1-52.
6. Hardeng F, Edge VL. Mastitis, ketosis, and milk fever in 31 organic and 93 conventional norwegian dairy herds. *J Dairy Sci*. 2001;84:2673-9.
7. Guidini SZ, Zanardi E, Battaglia A, Varisco G, Ferretti E, Campanini G, et al. Comparison of contaminant and residue levels in organic and conventional milk and meat products from northern Italy. *Food Addit Contam*. 2005;22:1-9.
8. Associação dos Agricultores Ecológicos das Encostas da Serra Geral - Agreco. História de Santa Rosa de Lima [Internet]. Santa Rosa de Lima – SC; 2008 [acesso em 2009 Mar 03]. Disponível em: <http://www.agreco.com.br/site.html>
9. Instituto Biodinâmico Certificações. Diretriz para o padrão de qualidade orgânico IBD [Internet]. Botucatu; 2008 [acesso em 2008 Dec 17]. Disponível em: <http://www.ibd.com.br>
10. Williams CM. Nutritional quality of organic food: shades of grey or shades of green? *Proc Nutr Soc*. 2002;61:19-24.
11. Molкетин J. Authentication of organic milk using delta 13C and the alpha-linolenic acid content of milk fat. *J Agric Food Chem*. 2009;57:785-90.
12. Liener IE. Toxins in cow's milk and human milk. *J Nutr Environ Med*. 2002;12:175-86.

13. Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional [Internet]. Brasília; 2009 [acesso em 2009 Mar 03]. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/Consea/exec/index.cfm>
14. Bourn D, Prescott J. A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2002;42:1-34.
15. Vaarst M, Enevoldsen C. Patterns of clinical mastitis manifestations in Danish organic dairy herds. *J Dairy Res.* 1997;64:1-23.
16. Hovi M, Hoderick S. Mastitis and mastitis control strategies in organic milk. *Cattle Pract.* 2000;8:259-64.
17. Roesch M, Doherr MG, Blum JW. Management, feeding, production, reproduction and udder health on organic and conventional Swiss dairy farms. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2006;148:387-95.
18. Roesch M. Subclinical mastitis in dairy cows in Swiss organic and conventional production systems. *J Dairy Res.* 2007;74:86-92.
19. Weller RF, Davies DW. Somatic cell counts and incidence of clinical mastitis in organic milk production. *Vet Rec.* 1998;143:365-6.
20. Bennedsgaard TW, Enevoldsen C, Thamsborg SM, Vaarst M. Effect of mastitis treatment and somatic cell counts on milk yield in Danish organic dairy cows. *J Dairy Sci.* 2003;86:3174-83.
21. Roesch M, Doherr MG, Blum JW. Performance of dairy cows on Swiss farms with organic and integrated production. *J Dairy Sci.* 2005;88:2462-75.
22. Rozzi P, Miglior F, Hand JK. A total merit selection index for Ontario organic dairy farmers. *J Dairy Sci.* 2007;90:1584-93.
23. Nauta WJ, Veerkamp RF, Brascamp EW, Bovenhuls H. Genotype by environment interaction for milk production traits between organic and conventional dairy cattle production in the Netherlands. *J. Dairy Sci.* 2006;89:2729-37.
24. Bowell VA, Rennie LG, Tierney G, Lawrence AB, Harskell MJ. Relationships between building design, management system and dairy cow welfare. *Anim Welf.* 2003;12:547-52.
25. Ellis KA, Innocent GT, Mihm M, Cripps P, McLean WG, Howard CV, et al. Dairy cow cleanliness and milk quality on organic and conventional farms in the UK. *J Dairy Res.* 2007;74:302-10.
26. Pol M, Ruegg PL. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *J Dairy Sci.* 2007;90:262-73.
27. Coorevits AJ, De Jonghe V, Vandroemme J, Reekmans R, Heyrman J, Messens W, et al. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Syst Appl Microbiol.* 2008;31:126-40.

28. Food and Agriculture Organization of the United Nations [Internet]. Roma; 2009 [cited 2009 Mar 03]. Available from: <http://www.fao.org>
29. Denobile M. Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, clortetraciclina em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2002.
30. Raia RBJ. Influência da mastite na ocorrência de resíduos antimicrobianos no leite [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2001.
31. Hamilton C, Emanuelson U, Forslund K, Hansson I, Ekman T. Mastitis and related management factors in certified organic dairy herds in Sweden. *Acta Vet Scand.* 2006; 48:11-8.
32. Tikosfsky LL, Barlow JW, Santisteban C, Schukken YH. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. *Microb Drug Resist.* 2003;9(Suppl 1):39-45.
33. Bombyk RAM, Bykowski AL, Draper CE, Savelkoul EJ, Sullivan LR, Wyckoff TJO. Comparison of types and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* from conventional and organic dairies in west-central Minnesota, USA. *J Appl Microbiol.* 2008;104:1726-31.
34. Halbert LW, Kaneene JB, Linz J, Mansfield LS, Wilson D, Ruegg PL, et al. Genetic mechanisms contributing to reduced tetracycline susceptibility of *Campylobacter* isolated from organic and conventional dairy farms in the midwestern and northeastern United States. *J Food Prot.* 2006;69:482-8.
35. Sato K, Bennedsgaard TW, Barrlett PC, Erskine RJ, Kaneene JB. Comparison of antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk in organic and conventional dairy herds in the midwestern United States and Denmark. *J Food Prot.* 2004;67:1104-10.
36. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [Internet]. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Brasília; 2002 [acesso em 2008 Nov 14]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>
37. Campos EP. Qualidade microbiológica, físico-química e pesquisa de resíduos de antibióticos e pesticidas no leite bovino, produzido pelo sistema convencional e pelo sistema orgânico [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.
38. Sato K, Bartlett PC, Saeed MA. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from dairy farms using organic versus conventional production methods. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;226:589-94.
39. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília; 1980.

40. Santos JS, Beck L, Walter M, Sobczak M, Olivo CJ, Costabeber I, et al. Nitratos e nitrito em leite produzido em sistemas convencional e orgânico. Cienc Tecnol Aliment. 2005;25:304-9.
41. Vaarst M, Padel S, Rymer C. Future perspective for animal health on organic farms: main findings, conclusions and recommendations from SAFO Network. In: Proceedings of the 5° SAFO Workshop; 2006, Odense. Odense, Denmark: The University of Reading; 2006. p.1.

**Recebido em: 05/05/11**

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

## AUTOHEMOTHERAPY AT ACUPUNCTURE POINTS POST ORCHIECTOMY SURGERY IN CART HORSES- EIGHT CASES REPORT

Pierre Barnabé Escodro<sup>1</sup>  
Jean G. Fernandes Joaquim<sup>2</sup>  
Tobias M. de Albuquerque Mariz<sup>3</sup>  
Aline Saraiva de Oliveira<sup>4</sup>  
Lucineia Oliveira Escodro<sup>5</sup>  
Elvan Nascimento Santos Filho<sup>6</sup>  
José Valmir Tenório Ferreira Junior<sup>7</sup>  
Juliana Oliveira Bernardo<sup>8</sup>

### ABSTRACT

In Northeastern of Brazil, due to local financial and cultural problems, the orchiectomies in cart horses is often done by lay people, with high rates of mortality and suffering to the animals. The aim of this article was to evaluate the use of the autohemotherapy post orchiectomy surgery at acupuncture points in eight cart horses, as a substitute technique for the use of analgesics and antibiotics, in places where such medical drugs are not available. None of the animals has shown fever, appetite change or significant change in the physiological parameters during the post surgical evaluation. Autohemotherapy at acupuncture points in the equine orchiectomies postoperative proved to be effective.

**Keywords:** cart horses, orchiectomy, postoperative, hemo-acupuncture

## AUTO-HEMOTERAPIA EM PONTOS DE ACUPUNTURA NOS PÓS-OPERATÓRIOS DE ORQUIECTOMIAS DE EQUINOS CARROCEIROS- RELATO DE OITO CASOS

### RESUMO

Na região Nordeste do Brasil, devido às dificuldades financeiras e culturais, as orquiectomias em cavalos de tração carroceiros são realizadas por leigos, com altos índices de mortalidade e sofrimento dos animais. O objetivo deste artigo foi avaliar a utilização da auto-hemoterapia em pontos de acupuntura nos pós-cirúrgicos de orquiectomias de equinos utilizados em carroça, na substituição da terapia convencional com analgésicos e antibióticos, em locais onde a utilização dos fármacos não é possível. Durante a avaliação dos casos, nenhum dos animais apresentou febre, mudança de apetite ou alterações significativas nos parâmetros fisiológicos. A auto-hemoterapia em pontos de acupuntura mostrou-se satisfatória em pós-operatórios de orquiectomias em equinos.

**Palavras-chave:** cavalos carroceiros, orquiectomia, pós-operatórios, hemo-acupuntura

<sup>1</sup> Professor Adjunto do Curso de Medicina Veterinária- Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

<sup>2</sup> Professor Drº do Instituto Bioethicus-Botucatu-SP

<sup>3</sup> Professor Adjunto de Equinocultura e Anatomia dos Animais Domésticos- Curso de Zootecnia-UFAL

<sup>4</sup> Graduada Curso de Medicina Veterinária e Bolsista de Desenvolvimento Institucional-UFAL

<sup>5</sup> Técnica em Enfermagem e Biomédica Pesquisadora do GRUPEQUI-UFAL

<sup>6</sup> Médico Veterinário do Curso de Medicina Veterinária-UFAL

<sup>7</sup> Graduando Curso de Medicina Veterinária e Bolsista Permanência Institucional-UFAL

<sup>8</sup> Graduando Curso de Medicina Veterinária e Bolsista de Iniciação em Inovação Tecnológica CNPq

## AUTOHEMOTERAPIA EN PUNTOS DE ACUPUNTURA EN EL POSTOPERATORIO DE ORQUIECTOMÍAS EN EQUINOS DE TRACCIÓN DE CARROZA- REPORTE DE OCHO CASOS

### RESUMEN

En la región noreste de Brasil, debido a las dificultades financieras y culturales, las orquiectomías de equinos de tracción de carroza son hechas por prácticos, con altas tasas de mortalidad y sufrimiento de los animales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la utilización de la autohemoterapia en puntos de acupuntura en el postoperatorio de orquiectomías de caballos de carroza, como sustituto a la terapia con analgésicos y antibióticos, en lugares donde el uso de las drogas no es posible. Durante la evaluación de los casos, ninguno de los animales mostró fiebre, cambios en el apetito o cambios significativos en los parámetros fisiológicos. La autohemoterapia en puntos de acupuntura fue satisfactoria en el postoperatorio de orquiectomías en equinos.

**Palabras clave:** caballos de tracción de carroza, orquiectomía, postoperatorios, hemoacupuntura

### INTRODUCTION

The Alagoas State, Northeastern of Brazil, has one of the lowest indexes of human development in Brazil. So, the cart horses used by people in that area are the financial source for many families, reaching in some municipalities 5 % of the economically active population (1).

The orchietomies of those animals are indicated to improve the behavior, to avoid transmission of genetic characteristics not desirable to the descendants and to limit some infect-contagious disease progression (2, 3). Due to financial and cultural problems, many owners avoid the surgical procedure done by certified veterinarians. So, many of these surgical procedures are done by lay people, without antisepsis and post surgical therapy, with high rates of mortality and suffering to the animals.

In order to demonstrate and teach the technique of orchietomy in standing position in equine cart horses from Alagoas State in practical classes for the discipline of Veterinary Surgical Technique and enable the surgery at a low cost for the poor community, this paper proposed the evaluation of the use of the postoperative technique of autohemotherapy at acupuncture points as a substitute medical therapy for the use of analgesics and antibiotics, leading to exemption of the surgical cost and promoting welfare in places where such medical drugs are not available.

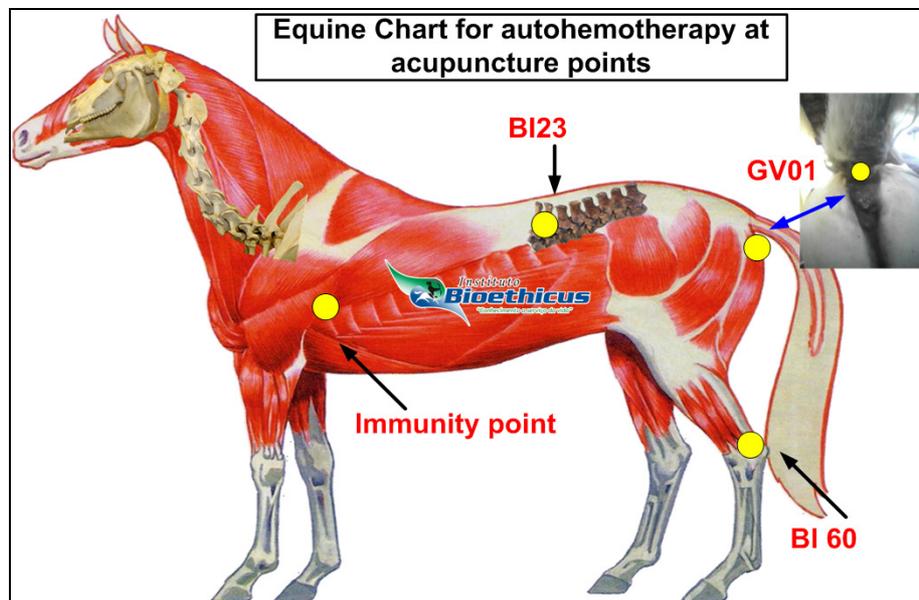
### CASES REPORT

This paper reports the cases of eight cart horses, without specific breed, with age ranging from 3 to 10 years, and weigh from 190 to 358kg, which after clinical exam were submitted to orchietomy using emasculator in standing position, under neuroleptic analgesia with acepromazine (0,05mg/kg) and after fifteen minutes xylazine (0,5mg/kg), both intravenously (IV), and local analgesia (lidocaine), as described by Finger et al. (2) and Lopes, Escobro and Silva (3). The only treatment done post surgery was autohemotherapy at acupuncture points immediately after the surgical procedure, followed by local dressings at surgical site. The volume used was 30ml of whole blood, collected from the left jugular vein, with puncture done with a 40mmX1,2mm needle and immediately administered with a 30mmX0,8mm

needle in four points: 10ml intramuscular, caudal to triceps brachial muscle, at an acupuncture point nominated as Immunity Point (IP); 5ml at 5cm lateral to the 2nd and 3th lumbar vertebra, at an acupuncture point nominated Bladder 23 (BI23); 5ml in between the Achilles tendon and the external tibial malleolus, at an acupuncture point nominated Bladder 60 (BI60) and 10ml in a depression between the anus and the tail, at an acupuncture point nominated Governador Vessel 01 (GV01). The points were chosen due to its properties on immunological system, genitourinary disturbance, lombossacral pain, edema, genital function and anti-inflammatory effects, according to Chinese Traditional Medicine theory (4-9).



**Fig. 1.** A-Location of acupoints used: Immunity Point (IP), Bladder 23 (BI23), Bladder 60 (BI60) and Governador Vessel 01 (GV01), in the lower right corner. B-Equine orchietomy using emasculator in standing position



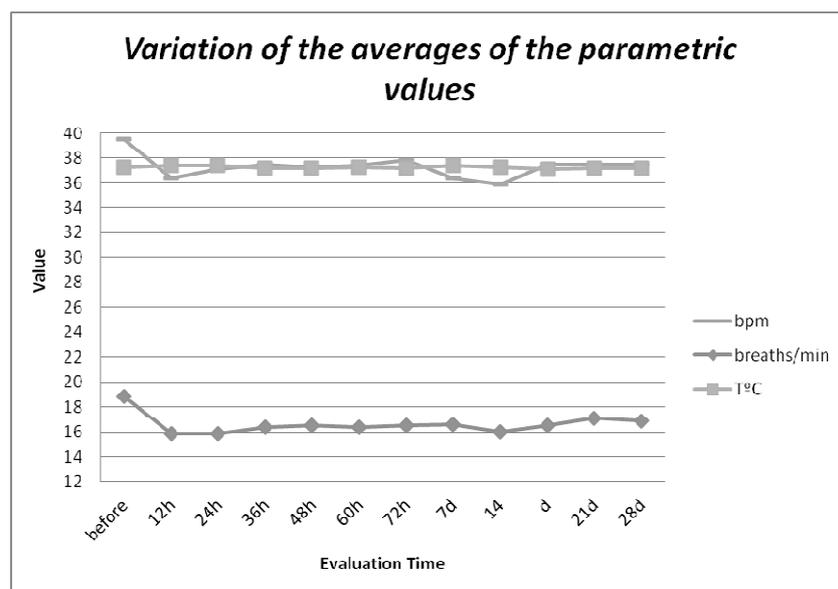
**Fig. 2.** Equine Chart for autohemotherapy at acupoints points post orchietomy surgery in cart horses

All patients were admitted at the vet school barn for the first 72h and been evaluated at every 8h in relationship to vital signs, appetite and surgical wound aspect. The vital signs evaluated were: heart rate (bpm), respiratory rate ( breaths/ min), temperature ( T°C), color of the oral mucosa and capillary refill time (CRT). Appetite was monitored through the ingestion of 1 kg of commercial feed every 8h, being: A- excellent appetite (ingestion of the total

quantity offered); B- good (ingestion of 50 to 90%); C-moderate (intake of 20 to 50%) and D- inhibited appetite (intakes below 20%). Surgical wound aspect was classified as follows: I- normal healing; II-healing with edema; III- healing with edema and mucus secretion and IV- healing with edema and purulent discharge. The surgical dressing was changed and checked every 12h through douche, povidone iodine and repellent spray. After this, all animals were evaluated every 7 days for 4 weeks.

Analyzing the signs it was observed that eight horses remained with normal color of the oral mucosa throughout the evaluated period; in relation of the appetite all remained in the A classification. Evaluating the surgical wound aspect, all animals showed the I or II classification, which is expected in post-operatives of horses orchiectomies. Only one horse was presented grade III with forty-eight hours post-procedure, possibly associated with difficulty of carrying out the dressing by aggressive behavior, returning to grade I in seven days.

The CRT of all the animals was between one and two seconds, which is considered normal for the species. The parametric parameters (bpm, hearth/min and T°C) were recorded and the distribution of response variables was analyzed and a descriptive statistic was produced. Linear Models for repeated measures (10) were used to compare the average of the parameters between the periods studied. Tukey's method was used to adjust the P-value resulting from the multiple comparisons between moments and the statistical significance was defined as  $P < 0.05$ . There was a difference between the averages, but there was no significant change ( $P > 0.05$ ), identifying that no animal had tachycardia, tachypnea or hyperthermia related to the lack of post-surgical therapy such as pain killers or antibiotics.



**Fig. 3.** Variation of the averages of the parametric values assessed during the reported cases. The changes were not statistically significant ( $P > 0.05$ ).

## DISCUSSION AND CONCLUSION

The orchiectomies in standing position under neuroleptoanalgesy and local anesthesia did not present any complications during surgery, being considered a satisfactory procedure for submission of the animals for such approach.

Autohemotherapy at acupuncture points in the postoperative of equine orchiectomies showed to be effective, without any complication or sign of interference in the welfare of animals, though there is a necessity of more studies comparing the physiological response of

equines submitted to autohemotherapy at acupuncture points in relationship to others submitted to conventional antibiotics and anti-inflammatory after post surgical procedure, validating this protocol in equine postoperative routine on communities with poor veterinary medical approach.

## REFERENCES

1. Escodro PB, Tonholo J, Fernandes T, Oliveira CF, Bernardo JO, Oliveira AS, et al. Projeto carroceiro em Alagoas: empreendedorismo e inovação no ensino de medicina veterinária e potencial multidisciplinar-resultados preliminares. *Rev Bras Med Equina*. 2010;30:26-30.
2. Finger MA, Dornbusch PT, Bonfá AF, Dornbusch LPTC, Deconto I, Barros Filho IR. Comparison of two techniques in equine orchietomy, employed in the instruction of the veterinary surgical technique. *Arch Vet Sci*. 2011;6:53-9.
3. Lopes PFR, Escodro PB, Silva RH. Estudo retrospectivo de orquiectomia em estação com uso do emasculador em 52 cavalos: 2002-2008. In: *Anais do 4º Simpósio Internacional do Cavalo Atleta; 2009, Belo Horizonte*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2009. p.26-8.
4. Cain M, Escodro PB, Luna SPL, Joaquim JGF, Hunziker ARO. Equine protozoal Myeloencephalitis: How predictable is the diagnosis with Acupressure? In: *Proceedings of 29th International Congress on Veterinary Acupuncture; 2002, Santos*. Fort Collins: IVAS; 2002. p.315-9.
5. Lade A. *Acupuncture points: images & functions*. Seattle: Eastland Press; 1989.
6. Scognamillo-Szabó MVR, Bechara GH. Acupuntura: histórico, bases teóricas e sua aplicação em medicina veterinária. *Cienc Rural*. 2010;40:491-500.
7. Pittler MH, Ernst E. Effectiveness of Acupuncture in veterinary medicine: systematic review. *J Vet Intern Med*. 2006;20:480-8.
8. Skarda RT, Tejwani GA, Muir WW. Cutaneous analgesia, hemodynamic and respiratory effects, and B-endorphin concentration in spinal fluid and plasma of horses after acupuncture and electroacupuncture. *Am J Vet Res*. 2002;63:1435-42.
9. Xie H, Preast V. *Xie's veterinary acupuncture*. Oxford: Blackwell; 2007.
10. SAS Institute. *SAS/STAT. User's Guide. Version 9.2*. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 2009.

**Recebido em: 06/07/12**

**Aceito em: 17/09/12**

## CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM UM CÃO COM ALOPECIA POR DILUIÇÃO DE COR

Mariana Isa Poci Palumbo<sup>1\*</sup>  
Viciany Erique Fabris<sup>2</sup>  
Luiz Henrique de Araújo Machado<sup>3</sup>

### RESUMO

O carcinoma de células escamosas é uma neoplasia maligna relacionada com regiões do corpo com poucos pelos e prejudicada pelo sol. A alopecia por diluição de cor é uma doença dermatológica relativamente incomum em cães, caracterizada pela perda dos pelos nas regiões de coloração diluída. O objetivo do presente trabalho é relatar a ocorrência de alopecia por diluição de cor associada a carcinoma de células escamosas em uma cadela da raça pinscher miniatura.

**Palavras-chave:** alopecia, melanina, displasia folicular, carcinoma, cães.

### SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN A DOG WITH COLOR DILUTION ALOPECIA

### ABSTRACT

The squamous cell carcinoma is a malignant tumor associated to little haired body areas which are exposed to sunlight. Alopecia by dilution of color is a relatively uncommon skin disease in dogs, characterized by loss of coat in the color-diluted areas of the skin. The aim of this study is to report a color dilution alopecia associated with squamous cell carcinoma in a female pinscher.

**Keywords:** alopecia, melanin, follicular dysplasia, carcinoma, dogs.

### CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EN UN PERRO CON ALOPECÍA POR DILUCIÓN DEL COLOR

### RESUMEN

El carcinoma de células escamosas es una neoplasia maligna relacionada con las regiones del cuerpo con poco pelo y lesionadas por el sol. La alopecia por dilución del color es una enfermedad de la piel poco frecuente en los perros, que se caracteriza por la pérdida de pelo en las regiones de color diluido. El objetivo de este trabajo es informar la presencia de alopecia por dilución del color asociada a carcinoma de células escamosas en una perra pinscher miniatura.

**Palabras clave:** alopecia, melanina, displasia folicular, carcinoma, perros.

<sup>1</sup> Pós- graduanda do Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ/UNESP-Botucatu. Distrito de Rubião Jr. S/N. Botucatu, CEP 18618-000-SP, Brasil. Telefone: (14) 8170-6918, palumboma11@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Prof. Dr. Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB - UNESP – Botucatu. Distrito de Rubião Jr. S/N. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, (14) 38116336, vfabris@fmb.unesp.br

<sup>3</sup> Prof. Adj. do Depto. de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu, Distrito de Rubião Jr. S/N. Botucatu – SP – Brasil, CEP 18618-000, (14) 38116336, henrique@fmvz.unesp.br

## INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE), também conhecido como carcinoma de células espinhosas, carcinoma espinocelular ou carcinoma epidermóide, é um tumor maligno dos queratinócitos (1), que responde por 15% dos tumores cutâneos em gatos, e por 5% das neoplasias cutâneas em cães (2). O CCE ocorre mais frequentemente na pele não pigmentada, com poucos pelos e exposta ao sol (2). A ocorrência da associação de papilomavirus e anormalidades genéticas e moleculares também está sendo discutida (3).

A alopecia por diluição de cor (ADC), também conhecida como alopecia do mutante da cor, é uma doença dermatológica hereditária relativamente incomum (4). A ADC afeta cães com coloração de pelos considerada “diluída”, uma vez que possuem sombreados de cinza e preto, caracterizando as cores “azuis”, “cinzas”, “castanhas” e “vermelhas” (5). A doença é caracterizada pela perda de pelos nas áreas de pigmentação diluída, e os principais sinais clínicos consistem em alopecia ou hipotricose progressiva em animal jovem (4). O mecanismo real para o desenvolvimento de alopecia por mutante de cor não é completamente conhecido (4, 6), mas os genes para cor de pelagem desempenham papel significativo na condição (7).

Apesar de muitos autores relatarem a exposição ao sol como um fator de predisposição ao desenvolvimento de CCE, não foram encontrados relatos na literatura consultada do desenvolvimento de CCE em animais com ADC. O objetivo do presente trabalho é relatar a ocorrência de alopecia por diluição da cor associada a carcinoma de células escamosas em uma cadela da raça pinscher.

## RELATO DE CASO

Uma cadela da raça pinscher miniatura com seis anos de idade foi atendida pelo Serviço de Dermatologia Veterinária do Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP, campus de Botucatu, com histórico de alopecia, prurido e lesões cutâneas ulceradas na região dorsal do corpo. O animal era bicolor (castanho e cinza), apresentava alopecia nas áreas de coloração cinza desde o primeiro ano de vida, e lesões nodulares ulceradas com evolução de aproximadamente dois anos e meio. Durante a anamnese, foi relatado que o animal apresentou infecções dermatológicas recidivantes durante toda a vida, sendo tratada por veterinário particular com antibioticoterapia sistêmica. Não foram registradas queixas de alterações relacionadas com doenças sistêmicas, e todos os parâmetros avaliados durante o exame físico estavam dentro dos padrões de normalidade.

O exame dermatológico mostrou alopecia restrita apenas às áreas de cobertura pilosa de coloração cinza, com presença de pelos fracos, opacos e quebradiços; além da presença de pelagem castanha normal (Figura 1A). Além disso, o animal apresentava lesões crostosas, eritematosas e nódulos ulcerados na região dorsal do corpo e cabeça (Figura 1B).

O exame parasitológico por raspado cutâneo foi negativo para ácaros. Realizou-se biópsia e histopatologia das lesões ulceradas e da pele íntegra, e prescreveu-se cefalexina (30mg/kg, por via oral, a cada 12 horas) para controlar a infecção bacteriana secundária, utilização de fotoprotetores, além do uso de colar protetor para evitar que o animal lambesse e contaminasse as feridas. Outra recomendação dada foi a de que se deveria evitar manipulação dos pelos, com banhos e escovações, como forma de se perder ainda mais pelos de epilação facilitada.

A análise microscópica da pele mostrou área de infiltração neoplásica com atipias celulares, formação de pérolas-córneas e ulceração da epiderme (Figuras 2A e 2B), compatível com carcinoma de células escamosas. A histopatologia da pele também confirmou o diagnóstico de alopecia por diluição da cor, evidenciando a atrofia de anexos, presença de pigmento melanínico em grumos nos folículos e ósteos piloros, além de macromelanossomas

formando agregados de melanina grosseira nos infundíbulo foliculares e perifoliculares (Figuras 2C e 2D).

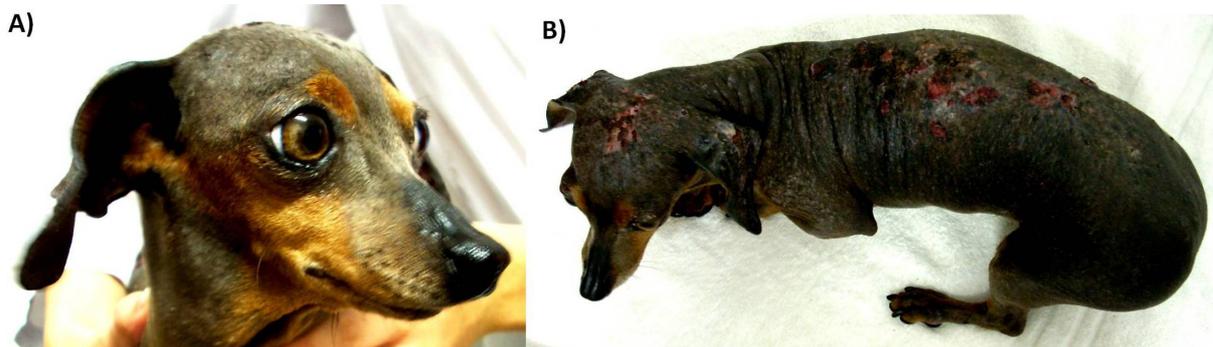


Figura 1. A) Animal apresentando região de pelame castanho normal e áreas de coloração “azul” alopecica; B) Feridas crostosas, eritematosas e nódulos ulcerados em região dorsal e cefálica.

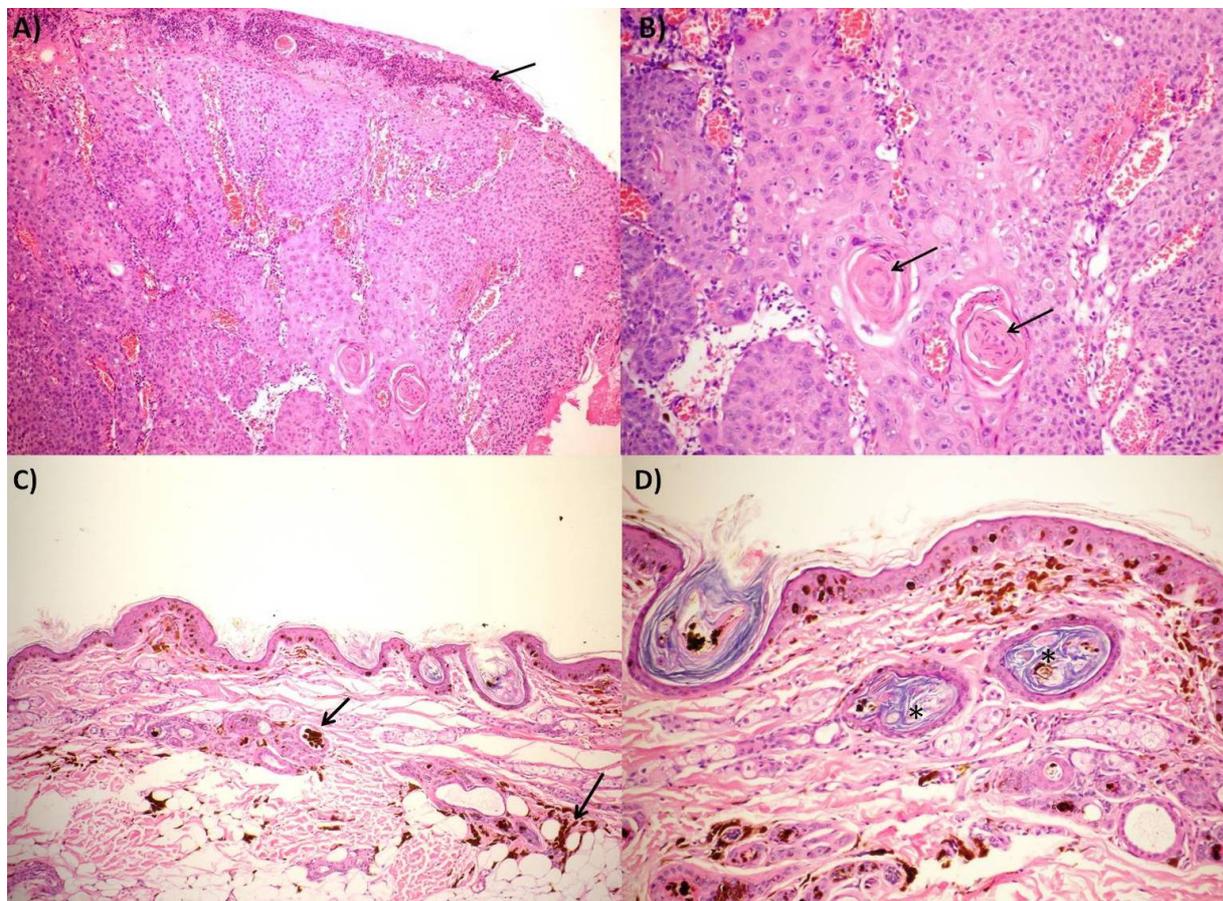


Figura 2. Carcinoma de células escamosas. A) Área de ulceração da epiderme (seta) e área de infiltração neoplásica; B) Atipias celulares e formação de pérolas córneas (setas); C) Atrofia de anexos, presença de pigmento melanínico em grumos nos folículos, ósteos piloros e livre na derme (setas); D) Macromelanossomos formam agregados de melanina grosseira nos infundíbulo foliculares e perifoliculares. Nota-se a evidência dos melanócitos epidérmicos (\*).

A despeito das recomendações dadas de manejo clínico e indicação de excisão cirúrgica, associada ou não a criocirurgia, dois dias após a realização da biópsia a proprietária optou pela realização da eutanásia do animal em veterinário particular.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Algumas condições inflamatórias cutâneas, como a dermatite crônica (8), lupus eritematoso discóide (9) e papilomavírus (10) estão sendo associadas com o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas em cães. Na literatura compilada, não foram encontrados relatos da ocorrência de CCE em cães com alopecia por diluição de cor.

A coloração da pelagem diluída em muitas raças é caracterizada por um fenótipo específico de pigmentação, e algumas vezes é acompanhada de perda de pelos e inflamação recorrente da pele, conhecida como alopecia por diluição de cor ou displasia folicular dos pelos pretos (11). Na ADC a área mais afetada é o tronco, podendo tardiamente afetar também a cabeça e membros (5). Os pelos da cobertura pilosa afetada apresentam-se opacos, fraturados, retorcidos e desprendem-se facilmente ao menor toque (5). O animal do presente relato era bicolor (castanho e cinza), e já não apresentava praticamente nenhum pelo nas áreas de coloração diluída.

A ADC é especialmente comum em animais da raça Doberman Pinscher (12), embora também ocorra em outras raças, incluindo Yorkshire Terrier, Pinscher miniatura, Great Dane, Whippet, Greyhound italiano, Saluki, Chow Chow, Dachshund, Silky Terrier, Boston Terrier, Newfoundland, Bernese Mountain, Shetland Sheepdog, Schipperke, Chihuahua, Poodle e Irish Setter (2). O primeiro relato de ADC em cães das raça Schnauzer foi feito em 2005 (4). No presente relato, o animal era da raça Pinscher miniatura, raça citada pela literatura como predisposta para o desenvolvimento da doença (2).

Em um estudo dos casos de displasia folicular todos os animais apresentavam história clínica semelhante, a idade de início das lesões variou de 1 a 3 anos, e a apresentação inicial incluiu hipotricose em tronco com piora progressiva (13), o que corrobora com os achados deste relato.

A pele das áreas afetadas é frequentemente escamosa e pode desenvolver infecção bacteriana (4). Todos os animais com displasia folicular incluídos em um estudo apresentaram episódios de foliculite/furunculose responsiva a antibióticos (13). A pele exposta fica sujeita a agressões, o que pode levar à foliculite recidivante e piodermite secundárias (11), fato observado neste caso. O animal relatado apresentava prurido intenso provavelmente devido ao desenvolvimento de infecção bacteriana secundária, e foi tratado com cefalexina.

O diagnóstico diferencial para as displasias foliculares incluem as endocrinopatias, principalmente o hipotireoidismo e o hiperadrenocorticism (alopecia difusa em tronco e piodermite recorrente) (13), porém o animal não apresentava nenhum outro sinal clínico compatível com alterações endócrinas.

A pele exposta dos cães afetados com alopecia por diluição da cor, frequentemente é seca e escamosa, além de ser mais sensível aos raios solares (4). A exposição prolongada à luz ultravioleta (especialmente a UVB) é reconhecida como fator importante no desenvolvimento de CCE invasivo, mas nem todos os CCE cutâneos são induzidos por luz ultravioleta (14). O CCE ocorre mais frequentemente na pele não pigmentada, com poucos pelos e exposta ao sol (2), e há uma grande possibilidade desta alopecia, juntamente com a exposição à luz solar, ter predisposto esse animal a desenvolver o carcinoma de células escamosas.

O diagnóstico da ADC é confirmado pela histopatologia da pele, que mostra folículos pilosos dilatados, císticos e preenchidos com ceratina (2). Notam-se aglomerados anormais de melanina nas células basais foliculares e epidérmicas, pelos e melanófagos peribulbares com incontinência pigmentar (2). Outros autores relataram a ADC em uma cadela pinsher com os seguintes achados de exame histopatológico: presença de acúmulo de melanina, aparecimento anormal de melanócitos e distrofia pilosa (15). A histopatologia da pele também confirma o diagnóstico de CCE, mostrando massas irregulares de ceratinócitos atípicos que se proliferam e invadem a derme (2).

Ainda não foi descrito tratamento específico para a cura da ADC (5, 13). Para o controle da queratinização preconiza-se a utilização de shampoos ceratomoduladores, antissépticos e emolientes (5). Autores tentaram tratar uma mestiça pinscher com ADC com a administração via oral de melatonina por três meses, porém não obtiveram melhora com o tratamento instituído (6).

A excisão cirúrgica ampla é o tratamento de escolha para o CCE e, em casos em que isso pode ser feito, o prognóstico é favorável (14). Os procedimentos cirúrgicos agressivos e a quimioterapia como modalidade isolada de tratamento ou associada à cirurgia, podem proporcionar a cura de alguns tumores ou, então, prolongar a sobrevivência dos pacientes (1). O CCE é moderadamente radiosensível, sendo a radioterapia uma alternativa de tratamento, ou medida adjuvante em casos em que a ressecção cirúrgica adequada não é possível (14). Nesse caso, o proprietário optou por não realizar nenhum tipo de tratamento específico.

O presente relato teve o intuito de demonstrar que as doenças que levam a modificações de cor dos pelos ou ainda as que facilitem a sua epilação devem ser melhor conduzidas, pois a despeito de serem consideradas muitas vezes, e por muitos, como doenças estéticas podem levar a doenças ainda mais graves, como as dermatites actínicas e carcinomas, fato que ocorreu neste caso após cinco anos de evolução.

## COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O número do protocolo do comitê de ética é: 182/2011.

## REFERÊNCIAS

- 1- Kim JH, Sohn H, Woo G, Jean Y, Hwang E. Color-dilution alopecia in dogs – case report. *J Vet Sci.* 2005;6:259-61.
- 2- Ferreira RR, Machado MLS, Aguiar J, Spanemberg A, Bianchi SP, Oliveira EC, et al. Displasias foliculares ligadas à cor da pelagem em cães: displasia folicular dos pêlos pretos e alopecia por diluição da cor. *Acta Sci Vet.* 2007;35:119-24.
- 3- Perego R, Proverbio R, Roccabianca P, Spada E. Color dilution alopecia in a Doberman pinscher crossbreed. *Can Vet J.* 2009;50:511-4.
- 4- Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Tumores neoplásicos e não neoplásicos. In: *Dermatologia de pequenos animais.* 5ª ed. Rio de Janeiro: Interlivros; 1996. p.926-1054.
- 5- Rocha JR, Santos LM, Trentin TC, Rocha FPC, Pacheco MD. Carcinoma de células escamosas em cães – relato de caso [Internet]. São Paulo; 2006 [acesso em 2010 Jul 29]. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria/relatos/RCEMV-AnoVIII-Edic14-RC10.pdf>
- 6- Medleau L, Hnilica KA. Alopecias hereditárias, congênicas e adquiridas. In: *Dermatologia de pequenos animais – atlas colorido e guia terapêutico.* 2ª ed. São Paulo: Roca; 2009. p.227-72.
- 7- Philipp U, Hamann H, Mecklenburg L, Nishino S, Mignot E, Günzel-Apel A, et al. Polymorphisms within the canine MLPH gene are associated with dilute coat color in dogs. *BMC Genet* [Internet]. 2005;6 [acesso 2012 Out 23]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/6/34>

- 8- Schmutz SM, Berryere TG. Black hair follicular dysplasia, an autosomal recessive condition in dogs. *Can Vet J.* 1998;39:644-6.
- 9- Dassot CL, Beco L, Carlotti DN. Follicular dysplasia in five Weimaraners. *Vet Dermatol.* 2002;13:253-60.
- 10- Morris J, Dobson J. Pele. In: *Oncologia em pequenos animais.* São Paulo: Roca; 2007. p.49-67.
- 11- Clerot LL, Oliveira R. Alopecia por diluição da cor em fêmea yorkshire terrier – relato de caso. *Arq Cienc Vet Zool UNIPAR.* 2004;7:23.
- 12- Vail DM, Withrow SJ. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: Withrow SJ, Vail DM. *Small animal clinical oncology.* 4ª ed. St. Louis: Elsevier; 2001.p.375-401.
- 13- Hargis AM, Thomassen RW, Phemister RD. Chronic dermatosis and cutaneous squamous cell carcinoma in the Beagle dog. *Vet Pathol.* 1977;14:218-28.
- 14- Scott DW, Miller WH. Squamous cell carcinoma arising in chronic discoid lupus erythematosus nasal lesions in two German. *Vet Dermatol.* 1995;6:99-104.
- 15- Callan MB, Preziosi D, Mauldin E. Multiple papillomavirus-associated epidermal hamartomas and squamous cell carcinomas in situ in a dog following chronic treatment with prednisone and cyclosporine. *Vet Dermatol.* 2005;16:338-45.

**Recebido em: 16/09/11**

**Aceito em: 17/10/12**

## PREVALÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA E ASSOCIAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS COM A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE VACAS LEITEIRAS DA REGIÃO SUDOESTE DO PARANÁ<sup>1</sup>.

Priscila Luiza Mello<sup>2</sup>  
Renata Olivotto Agostinis<sup>3</sup>  
Eliane Michalczuk Barzon<sup>4</sup>  
Rafael Barros Colombo<sup>3</sup>  
Aristeu Vieira da Silva<sup>5</sup>  
Lisiane de Almeida Martins<sup>6</sup>

### RESUMO

A mastite é considerada um dos problemas mais frequentes na pecuária leiteira, visto que desencadeia grandes prejuízos econômicos, além dos danos à saúde pública, pela veiculação de micro-organismos no leite. O diagnóstico é baseado em testes que verificam o conteúdo leucocitário do leite, como a contagem de células somáticas (CCS). Com o objetivo de determinar a prevalência da mastite bovina e o efeito dos agentes etiológicos envolvidos sobre a CCS de vacas leiteiras da região Sudoeste do Paraná, realizaram-se coletas de leite em 21 propriedades que apresentavam média de nove animais, de acordo com os municípios de maior produção leiteira, a saber: Realeza, Capanema, Santa Isabel do Oeste, Planalto e Nova Esperança do Sudoeste. Os rebanhos foram amostrados duas vezes no período de um ano. Considerando o total de 381 amostras, foi verificado que a prevalência da mastite nas duas coletas variou de 70,5% a 81,9%. A partir da CCS, amostras com isolamento de pelo menos um patógeno da mastite revelaram valores medianos de 346.000 células/mL e 121.000 células/mL na primeira e segunda coleta, respectivamente. O gênero *Staphylococcus* foi o agente etiológico mais prevalente na mastite. Em contraste, quando se compara o patógeno e sua relação com a CCS, *Streptococcus agalactiae* foi o micro-organismo mais patogênico.

**Palavras-chave:** mastite, bovino, contagem de células somáticas, prevalência, etiologia.

### PREVALENCE OF MASTITIS AND ASSOCIATION OF ETIOLOGIC AGENTS WITH SOMATIC CELL COUNT OF DAIRY COWS IN THE SOUTHWESTERN REGION OF PARANA.

### ABSTRACT

Bovine mastitis is considered a major problem in the dairy farms, due to provokes large economic losses, well as damage to public health, through the placement of microorganisms in milk. The diagnosis is based on tests that verify the leukocyte content of milk, such as the somatic cell count (SCC) is an example of test used. Aiming to determine the prevalence of bovine mastitis and the effect of these etiologic agents involved on the SCC of dairy cows in the southwestern region of Paraná were carried out collections of milk samples in 21 properties that had an average of nine animals, according to the towns with higher milk

<sup>1</sup> Projeto desenvolvido em parceria com a EMBRAPA Gado de Leite e financiado pelo CNPq.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação - Mestrado em Ciência Animal - Universidade Paranaense - UNIPAR - Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial - Nível III - CNPq. E-mail: priscila\_mello@msn.com - Praça Mascarenhas de Moraes, 4282 - Centro. CEP: 87. 502- 210 - Telefone (44) 3639-6148. Umuarama - PR.

<sup>3</sup> Acadêmico (a) do Curso de Medicina Veterinária - Bolsista PIBIC - UNIPAR - Umuarama - PR.

<sup>4</sup> Programa de Pós-graduação - Mestrado em Ciência Animal - Bolsista PIT - UNIPAR - Umuarama - PR.

<sup>5</sup> Docente da Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS - BA.

<sup>6</sup> Docente do Mestrado em Ciência Animal e do Curso de Medicina Veterinária da UNIPAR - Umuarama - PR.

production: Realeza, Capanema, Santa Isabel do Oeste, Planalto e Nova Esperança do Sudoeste. The herds were sampled twice within a year. Considering a total of 381 samples, it was found that the prevalence of mastitis in both collections ranged from 70.5% to 81.9%. From the SCC, samples with isolation of at least one mastitis pathogen showed median values of 346,000 cells/ mL and 121,000 cells /mL in the first and second test, respectively. The genus *Staphylococcus* was the most prevalent etiologic agent of mastitis in herds. In contrast, when comparing the pathogen and its relation to the number of somatic cells, *Streptococcus agalactiae* was the most pathogenic.

**Keywords:** mastitis, bovine, somatic cell count, prevalence, etiology.

## PREVALENCIA DE LA MASTITIS Y ASOCIACIÓN DE LOS AGENTES ETIOLÓGICOS CON EL CONTEO DE CELULAS SOMÁTICAS DE VACAS LECHERAS DE LA REGIÓN SUROESTE DE PARANÁ.

### RESUMEN

La mastitis es considerada como uno de los problemas más frecuentes en la pecuaria lechera, ya que desencadena gran pérdidas económicos, además de los problemas de salud pública, debido a presencia de microorganismos en la leche. El diagnóstico se basa en las pruebas que verifican el contenido de leucocitos en la leche, por ejemplo, conteo de células somáticas (CCS). Con el objetivo de determinar la prevalencia de mastitis bovina y el efecto de los agentes etiológicos involucrados sobre la CCS de vacas lecheras en la región suroeste del Paraná, fueron realizados muestreos de leche en 21 propiedades con nueve animales como promedio, de acuerdo con los municipios con mayor producción de leche, a saber: Realeza, Capanema, Santa Isabel do Oeste, Planalto y Nova Esperança do Sudoeste. Se realizó el muestreo de los rebaños dos veces en un período de un año. Teniendo en cuenta el total de 381 muestras, se encontró que la prevalencia de mastitis en las muestras varió de 70,5% a 81,9%. A partir del CCS, las muestras en las que fue realizado aislamiento de por lo menos un patógeno causante de mastitis mostraron valores promedios de 346.000 células / ml y 121.000 células / ml en la primera y segunda colectas, respectivamente. El género *Staphylococcus* fue el agente etiológico más frecuente en la mastitis en los rebaños muestreados. En contraste, al comparar el patógeno y su relación con la CCS, *Streptococcus agalactiae* fue el microorganismo más patógeno.

**Palabras clave:** mastitis, bovino, conteo de células somáticas, prevalencia, etiología.

### INTRODUÇÃO

Assim como demais segmentos da atual sociedade, a produção de leite tem se mostrado cada vez mais competitiva. Portanto, é de suma importância qualificar e quantificar os fatores que possam influenciá-la, visando ganhos efetivos na qualidade e quantidade do leite produzido, na tentativa de suprir a demanda nacional (1).

A mastite é reconhecida como um dos problemas sanitários mais frequentes da pecuária leiteira, que desencadeia grandes perdas econômicas e menor rendimento dos produtos lácteos (2), além dos danos à saúde pública, por meio da veiculação de micro-organismos e toxinas no leite (3).

Tendo em vista o grande número de casos subclínicos de mastite, seu diagnóstico é baseado em testes que dependem do conteúdo leucocitário do leite (4). Dentre estes, a contagem de células somáticas (CCS) permite monitorar a mastite subclínica e fornece ainda,

informações sobre a qualidade do leite, visto que as mastites alteram a composição do produto, com redução nos teores de lactose, gordura e caseína e elevação dos teores de sódio e cloro (5).

A classificação do tipo de mastite depende do isolamento e identificação do agente etiológico envolvido permitindo diferenciá-los em ambientais ou infecciosos (4), pois dependendo do agente ou do padrão de infecção, são adotadas estratégias distintas com a finalidade de controlar e prevenir a doença (6). Vários micro-organismos são citados como agentes etiológicos da mastite bovina, e segundo Radostitis et al. (7) podem ser divididos em patógenos primários que incluem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Arcanobacterium pyogenes*, e patógenos secundários, como *Staphylococcus coagulase-negativos* e *Corynebacterium bovis*.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (8) em 2006, a produção anual de leite bovino no Estado do Paraná foi de 1.816.426 mil litros. Apesar desse elevado número na produção leiteira, existem poucos trabalhos sobre etiologia e prevalência da mastite subclínica na região Sudoeste do Paraná, considerando esta uma bacia emergente.

O presente estudo investigou a prevalência da mastite bovina e o efeito dos agentes etiológicos envolvidos na CCS de vacas leiteiras da região Sudoeste do Paraná.

## MATERIAL E MÉTODOS

A inclusão das propriedades no estudo ocorreu por sorteio dos criatórios cadastrados no laticínio, abrangendo os municípios de Realeza, Capanema, Santa Isabel do Oeste, Planalto e Nova Esperança do Sudoeste, no qual o número inicial era de 293 propriedades que foram divididas em classes, levando em conta o número de animais. Foi estabelecido número máximo de 21 propriedades. Em seguida foi realizado sorteio simples dos rebanhos de cada classe com 6-10 animais, 11-15, 16-20, 21-25 e 26-30 animais. Desse modo, as populações alvo apresentavam uma média de nove animais e características diversas quanto à raça e tipos de ordenha. Os rebanhos foram visitados e amostrados nos meses de julho e outubro do mesmo ano, totalizando 381 amostras analisadas (9).

As amostras de leite foram compostas dos quatro quartos mamários e coletadas diretamente em frascos esterilizados para exames microbiológicos e outro frasco específico contendo o conservante bromopol para a CCS. A contagem celular foi realizada pelo Laboratório do Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) em equipamento de citometria de fluxo<sup>7</sup>.

As amostras para exame microbiológico foram congeladas a -20°C e mantidas nessa condição até serem transportadas ao laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da Universidade Paranaense, onde foram processadas em até quatro semanas. As placas foram interpretadas segundo critérios propostos pelo National Mastitis Council - NMC (10).

As frequências de positivos no exame microbiológico foram tabuladas com as amostras negativas, de forma a verificar a associação dos resultados pelo teste de  $\chi^2$ . A avaliação geral da variação da CCS segundo as coletas e resultado do exame microbiológico foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. A comparação entre o resultado da CCS segundo os micro-organismos isolados e as coletas, foi realizada pelo Teste G de Willians e Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) com intuito de verificar a relação do número de amostras avaliadas, contagem de CCS e o resultado do exame microbiológico (11).

<sup>7</sup> Somacount 500 – Bentley Instruments, Inc., Estados Unidos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta a frequência do resultado dos exames microbiológicos de amostras de leite bovino compostas dos quatro quartos mamários na primeira e segunda coleta. Considerando o total de 381 amostras de leite estudadas durante o acompanhamento dos animais, verificou-se que 136 (70,5%) foram positivas no exame microbiológico na primeira coleta e 154 (81,9%) na segunda, sendo esta diferença estatisticamente significativa. No entanto, treze (3,41%) amostras de leite foram consideradas contaminadas, pois houve o isolamento de mais de três tipos de colônias, não sendo possível identificar as mesmas com um resultado confiável.

Tabela 1. Frequência absoluta (N), relativa (%) e intervalo de confiança 95% (IC95%) do resultado dos exames microbiológicos de amostras de leite bovino compostas dos quatro quartos mamários, segundo a coleta. Realeza, PR, 2010.

Exame microbiológico	Coletas								Total	
	1				2					
	N	%	LI <sub>IC95%</sub>	LS <sub>IC95%</sub>	N	%	LI <sub>IC95%</sub>	LS <sub>IC95%</sub>	N	%
Um micro-organismo	121	62,7 <sup>a</sup>	55,7	69,2	142	75,5 <sup>b</sup>	68,9	81,1	263	69,0
Dois micro-organismos	15	7,8 <sup>a</sup>	4,8	12,4	12	6,4 <sup>a</sup>	3,7	10,8	27	7,1
Negativo	54	28,0 <sup>b</sup>	22,1	34,7	24	12,8 <sup>a</sup>	8,7	18,3	78	20,5
TOTAL	193	50,7	45,6	55,6	188	49,3	44,3	54,3	381	100,0

Estatística:  $\chi^2=17,21$ ; valor de  $P=0,0006$ . Para uma mesma linha, valores de frequência relativa seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre as frequências.

LI: Limite inferior; LS: Limite superior; IC: Intervalo de confiança.

Segundo Coldebella et al. (12) as vacas paridas no inverno na maioria das vezes terminam a lactação no verão, período menos favorável à produção de leite, principalmente pelas temperaturas elevadas. Assim, um dos fatores que pode ter influenciado na diferença significativa entre as coletas são as diferenças de temperatura e umidade nas estações do ano, visto que a primeira ocorreu em um período de inverno e a segunda no verão, o que poderia justificar o aumento na prevalência da mastite bovina no mês de verão, já que os micro-organismos se proliferam com mais facilidade em temperaturas mais elevadas, associadas a alta umidade.

Radostitis et al. (4) retratam que em vários países a prevalência de mastite subclínica atinge aproximadamente 50% das vacas. Ao contrário, no presente estudo foram encontrados valores acima de 70% nas duas coletas. Este achado revela de forma preocupante a alta ocorrência de infecções mamárias nos rebanhos amostrados, e a necessidade de adoção sistemática de medidas de controle e profilaxia da mastite.

Para Ribeiro et al. (13) a mastite não deve superar 15% para as manifestações subclínicas, o que nos leva a verificar que os achados obtidos nos rebanhos encontram-se muito distantes dos índices considerados satisfatórios para a doença.

Souza et al. (14) descreveram a presença de pelo menos um patógeno da mastite em 69,7% dos animais estudados, enquanto Martins et al. (15) encontraram 65% na microrregião de Cuiabá. No estado de São Paulo, na região de Pirassununga (16) esse valor foi de 63,6%. No entanto esses resultados são inferiores aos apresentados no presente estudo, o que

demonstra a variação dos índices de acordo com a região e conseqüentemente o tipo de manejo.

Na CCS, as amostras que acusaram isolamento de pelo menos um patógeno da mastite revelaram valores medianos de 346.000 células/mL e 121.000 células/mL na primeira e segunda coleta, respectivamente (Tabela 2). Este achado mostra diminuição significativa da CCS na segunda coleta, quando comparada com os animais positivos no exame microbiológico da primeira coleta.

Tabela 2. Resultados de exames microbiológicos e de CCS de amostras compostas dos quartos mamários de vacas em lactação. Realeza, PR, 2010.

Coletas	Resultado						
	Microbiológico	N	Mediana	Mínimo	P25	P75	Máximo
1	Positivo	120	346,0 <sup>b</sup>	3,0	124,5	801,5	6686,0
	Negativo	52	97,0 <sup>a</sup>	1,0	19,0	204,5	5542,0
2	Positivo	131	121,0 <sup>a</sup>	3,0	37,0	402,0	3276,0
	Negativo	22	107,0 <sup>a</sup>	1,0	20,0	335,0	70,90

Estatística: Para uma mesma coleta, medianas de CCS seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste de Mann-Whitney (valor de  $p < 0,05$ ).

As amostras de leite sem isolamento bacteriano apresentaram mediana na CCS de 97.000 células/mL na primeira coleta realizada no mês de junho e uma mediana de 107.000 células/mL na segunda coleta que ocorreu no mês de outubro. Esses valores são similares aos obtidos por Philpot e Nickerson (17), que afirmam que contagens inferiores a 200.000 células/mL provavelmente não indicam infecção da glândula mamária.

Harmon et al. (18) sugerem que vacas com celularidade superior a 250.000 células/mL apresentem mastite subclínica. No presente estudo, somente a mediana de vacas positivas no microbiológico da segunda coleta foi menor que 250.000 células/mL. Assim, faz-se, importante considerar que fatores como idade, período de lactação ordem de parto, mês e estações do ano e, principalmente, o estado de infecção e tipo de micro-organismos podem influenciar a CCS (17).

Souza et al. (14) em estudo realizado em municípios dos estados de MG e RJ encontraram mediana de 240.000 células/mL, enquanto Coentrão et al. (19) encontraram a mediana de 219.000 células/mL. Esses valores estão abaixo da mediana encontrada no presente estudo.

Contagens celulares de 200.000, 500.000, 800.000 e 1.000.000/mL indicam diminuição na produção de leite de 6%, 9%, 11% e 12%, respectivamente (17). A alta celularidade encontrada nos rebanhos estudados reforça a necessidade de adoção de boas práticas de ordenha com vistas à redução da ocorrência de infecções mamárias e, conseqüentemente, da celularidade do leite. No entanto, a celularidade média dos rebanhos foi abaixo de 750.000 células/mL, considerado o limite para entrega do leite pela Instrução Normativa 51 do MAPA (20).

Analisando a frequência dos micro-organismos isolados, foi verificado que o gênero *Staphylococcus* spp. foi o mais frequente nas duas coletas, classificado em três espécies: *Staphylococcus* coagulase negativos, *Staphylococcus* coagulase positivos e *Staphylococcus aureus*. Já o gênero *Streptococcus* spp. foi isolado também em alta frequência, classificado nas seguintes espécies: *Streptococcus* sp. (esculina positivos), *Streptococcus equinus*, *Streptococcus* sp. (esculina negativos), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência absoluta (N) e relativa (%) do resultado do exame microbiológico de amostras de leite bovino compostas dos quatro quartos mamários, segundo a coleta. Realeza, PR, 2010.

Exame microbiológico	Coleta								TOTAL	
	1				2				N	%
	N	%	LI <sub>IC95%</sub>	LS <sub>IC95%</sub>	N	%	LI <sub>IC95%</sub>	LS <sub>IC95%</sub>		
<i>S. esculina</i> positivos	0	0.0	0.0	2.1	2	1.3	0.4	4.6	2	0.6
<i>Enterococcus</i> spp.	1	0.6	0.1	3.2	0	0.0	0.0	2.4	1	0.3
Leveduras	1	0.6	0.1	3.2	0	0.0	0.0	2.4	1	0.3
<i>S. equinus</i>	1	0.6	0.1	3.2	0	0.0	0.0	2.4	1	0.3
<i>S. esculina</i> negativos	3	1.7	0.6	5.0	3	2.0	0.4	4.6	6	1.8
<i>S. dysgalactiae</i>	3	1.7	0.6	5.0	5	3.3	1.4	7.4	8	2.5
<i>A. pyogenes</i>	6	3.5	1.6	7.4	13	8.5	5.0	14.0	19	5.8
<i>S. agalactiae</i>	6	3.5	1.6	7.4	4	2.6	1.1	6.5	10	3.1
<i>S. uberis</i>	6	3.5	1.6	7.4	1	0.7	0.1	3.6	7	2.2
<i>Corynebacterium</i> spp.	9	5.2	2.8	9.6	20	13.1	8.6	19.3	29	8.9
<i>S. coagulase</i> positivos	9	5.2	2.8	9.6	12	7.8	4.6	13.2	21	6.5
<i>S. aureus</i>	14	8.1	4.9	13.2	22	14.4	9.7	20.8	36	11.1
<i>S. coagulase</i> negativos	61	35.5	28.7	42.9	49	32.0	25.2	39.8	110	33.8
Não houve crescimento	52	30.2	23.9	37.5	22	14.4	9.7	20.8	74	22.8
<b>TOTAL</b>	<b>172</b>	<b>52.9</b>	<b>47.5</b>	<b>58.3</b>	<b>153</b>	<b>47.1</b>	<b>41.7</b>	<b>52.5</b>	<b>325</b>	<b>100.0</b>

Estatística: Teste G de Willians = 28,95; valor de p = 0,0067.

*S. esculina* positivos: *Streptococcus esculina* positivos, *S. equinus*: *Streptococcus equinus*, *S. esculina* negativos: *Streptococcus esculina* negativos, *S. dysgalactiae*: *Streptococcus dysgalactiae*, *A. pyogenes*: *Arcanobacterium pyogenes*, *S. agalactiae*: *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*: *Streptococcus uberis*, *S. coagulase* positivos: *Staphylococcus coagulase* positivos, *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*.

LI: Limite inferior; LS: Limite superior; IC: Intervalo de confiança.

Brito et al. (6) revelaram que os *Staphylococcus* spp., seguidos de *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., são os principais micro-organismos envolvidos na gênese da mastite bovina (6).

O gênero *Streptococcus* spp. apareceu na sequência, o que coincidiu com os achados de Ferreira et al. (21).

No presente estudo os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium* também foram os mais prevalentes. Este achado caracteriza ocorrência de mastite do tipo contagioso, e indica a necessidade de medidas de melhor higiene na ordenha e adoção do *pós-dipping* para o controle da mastite.

Ao relacionar a mediana da CCS e o resultado do exame microbiológico de acordo com a coleta avaliada (Tabela 4) nota-se que *Streptococcus agalactiae* apresentou diferença significativa e maior mediana de CCS quando comparado aos demais micro-organismos na primeira coleta. Já na segunda coleta, nenhum deles diferiu estatisticamente entre si.

Souza et al. (14) e Viana et al. (22) também observaram a maior elevação da CCS causada por *Streptococcus agalactiae*, reforçando a influência das infecções mamárias por este micro-organismo na celularidade do leite.

*Staphylococcus coagulase* negativa e *Streptococcus agalactiae* apresentaram uma elevada CCS na primeira coleta e baixa contagem na segunda. Segundo Souza et al. (14) a variação da CCS entre animais para o mesmo patógeno, provavelmente sofre influência de características como o período de lactação e idade.

Tabela 4. Correlação do resultado microbiológico e CCS de amostras de leite bovino compostas dos quatro quartos mamários, segundo a coleta avaliada e o resultado do exame microbiológico. Realeza, PR, 2010.

Microorganismo	Coleta											
	1						2					
	N	Mediana	Mínimo	P25	P75	Máximo	N	Mediana	Mínimo	P25	P75	Máximo
<i>S. esculina</i> positivos	0	-	-	-	-	-	2	1046,5 <sup>A</sup>	332,0	332,0	1761,0	1761,0
<i>Enterococcus</i> spp.	1	475,0 <sup>BA</sup>	475,0	475,0	475,0	475,0	0	-	-	-	-	-
Leveduras	1	956,0 <sup>BA</sup>	956,0	956,0	956,0	956,0	0	-	-	-	-	-
<i>S. esculina</i> negativos	3	467,0 <sup>BAa</sup>	208,0	208,0	4772,0	4772,0	3	693,0 <sup>Aa</sup>	121,0	121,0	1515,0	1515,0
<i>S. dysgalactiae</i>	3	491,0 <sup>BAa</sup>	426,0	426,0	1176,0	1176,0	5	67,0 <sup>Aa</sup>	29,0	66,0	164,0	534,0
<i>A. pyogenes</i>	6	593,5 <sup>BAa</sup>	145,0	436,0	856,0	2011,0	13	312,0 <sup>Aa</sup>	5,0	77,0	591,0	2184,0
<i>S. agalactiae</i>	6	2611,5 <sup>Bb</sup>	282,0	1068,0	5158,0	6686,0	4	140,5 <sup>Aa</sup>	3,0	7,0	456,5	643,0
<i>S. uberis</i>	6	669,0 <sup>BAa</sup>	156,0	353,0	1395,0	1745,0	1	221,0 <sup>Aa</sup>	221,0	221,0	221,0	221,0
<i>Corynebacterium</i> spp.	9	167,0 <sup>BAa</sup>	26,0	93,0	268,0	717,0	20	320,5 <sup>Aa</sup>	5,0	88,5	671,0	2798,0
<i>S. coagulase</i> positivos	9	382,0 <sup>BAa</sup>	16,0	212,0	481,0	968,0	12	100,5 <sup>Aa</sup>	8,0	41,0	424,0	2359,0
<i>S. aureus</i>	14	195,0 <sup>BAa</sup>	19,0	58,0	1420,0	3118,0	22	96,0 <sup>Aa</sup>	4,0	31,0	196,0	574,0
<i>S. coagulase</i> negativos	61	238,0 <sup>BAb</sup>	3,0	81,0	660,0	6461,0	49	63,0 <sup>Aa</sup>	3,0	30,0	233,0	3276,0
Não houve crescimento	52	97,0 <sup>Aa</sup>	1,0	19,0	204,5	5542,0	22	107,0 <sup>Aa</sup>	1,0	20,0	335,0	709,0

**Estatística:** Para uma mesma coleta, medianas de CCS seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os microrganismos, pelo teste de Kruskal-Wallis (valor de  $p < 0,05$ ); para um mesmo microrganismo, medianas de CCS seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os microrganismos, pelo teste de Mann-Whitney (valor de  $p < 0,05$ ).

*S. esculina* positivos: *Streptococcus esculina* positivos, *S. esculina* negativos: *Streptococcus esculina* negativos, *S. dysgalactiae*: *Streptococcus dysgalactiae*, *A. pyogenes*: *Arcanobacterium pyogenes*, *S. agalactiae*: *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*: *Streptococcus uberis*, *S. coagulase* positivos: *Staphylococcus coagulase* positivos, *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*.

Zafalon et al. (23) citaram uma diminuição de 16,7% na produção de leite, em quartos mamários com infecções por *Staphylococcus coagulase*-negativa, com uma CCS média de 722.000 células/mL e, nas infecções por *Corynebacterium* spp. com CCS de 888.000 células/mL de leite, a perda foi de 30,9%. Baseado nestes dados, estima-se que o rebanho estudado apresente perdas semelhantes no que refere-se a produção e qualidade do leite, tendo em vista os micro-organismos.

## CONCLUSÃO

Foi observada alta ocorrência da mastite nas duas coletas, entre 70,5% a 81,9%, com predomínio de micro-organismos contagiosos, o que indica necessidade de melhoria das condições de higiene na ordenha. A tendência de aumento da celularidade nos meses quentes do ano sugere influência da temperatura e umidade nas taxas de infecção mamária em vacas neste período do ano.

## AGRADECIMENTOS

A UNIPAR por disponibilizar a infra-estrutura.

Ao CNPq e EMBRAPA pelo financiamento, bolsa e assessoria.

A LATCO pela cooperação e apoio técnico na realização das coletas.

## COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANCA

O referido estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC – Lages-SC protocolado sob número 1.34.09.

## REFERÊNCIAS

1. Coldebella A, Machado PF, Demétrio CGB, Ribeiro Jr PJ, Meyer PM, Corassin CH, et al. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas. *Rev Bras Zootec.* 2004;33:623-34.
2. Halasa T, Huips K, Osteras O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q.* 2007;29:18-31.
3. Carter GR, Chengappa MM, Roberts AW. *Essentials of veterinary microbiology.* 5ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995.
4. Radostits OM, Blood DC, Gay CC. *Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
5. Politis I, Ng-Kwai Hang KF. Association between somatic cell count of milk and cheese-yielding capacity. *J Dairy Sci.* 1988;71:1720-7.
6. Brito MAVP, Brito JRF, Ribeiro MT, Veiga VMO. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1999;51:129-35.
7. Radostitis OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary medicine: a textbook of the disease of cattle, horse, sheep, pigs and goats.* Edinburgh: Saunders Elsevier; 2007.
8. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. Censo agropecuário 2006 – Estado do Paraná [acesso 2011 Fev 23]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>
9. Brito MAVP. Centro de monitoramento e vigilância da resistência antimicrobiana em bactérias patogênicas para o gado de leite. Juiz de Fora: Embrapa; 2008.
10. National Mastitis Council. *Microbiological producers for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality.* Verona: NMC; 2004.
11. Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá; 2007.
12. Coldebella A, Machado PF, Demétrio CGB, Ribeiro Jr PJ, Corassin CH, Meyer PM, et al. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas de alta produção. *Pesqui Agropecu Bras.* 2003;12:1451-7.
13. Ribeiro MER, Petrini LA, Barbosa RS, Zanela MB, Gomes JF, Stumpf Jr W, et al. Ocorrência de mastite causada por *nocardia spp.* em rebanhos de unidades de produção leiteira no sul do Rio Grande do Sul. *Rev Bras Agrocienc.* 2006;12:471-3.

14. Souza GN, Brito JRF, Moreira EC, Brito MAVP, Silva MVGB. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2009;61:1015-20.
15. Martins RP, Silva JAG, Nakazato L, Dutra V, Almeida Filho ES. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. *Cienc Anim Bras.* 2010;11:181-7.
16. Bueno VFF, Nicolau ES, Mesquita AJ, Ribeiro AR, Silva JAB, Costa EO, et al. Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: frequências e redução na produção. *Cienc Anim Bras.* 2002;3:47-52.
17. Philpot WN, Nickerson SC. *Mastitis: counter attack.* Naperville: Babson Bros; 1992.
18. Harmon RJ, Eberhart RJ, Jasper DE, Langlois BE, Wilson RA. *Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection.* Arlington: National Mastitis Concil; 1990.
19. Coentrão CM, Souza GN, Brito JRF, Brito MAVP, Lilenbaum W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2008;60:283-8.
20. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite tipo A, tipo B, tipo C, pasteurizado e cru refrigerado e o Regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da União, Brasília (DF),* 2002 Set 18.
21. Ferreira JL, Lins JLFHA, Cavalcante TV, Macedo NA, Borjas ALR. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. *Cienc Anim Bras.* 2007;8:261-6.
22. Viana LC, Muller EE, Freitas JC, Giordano LGP, Salvador R, Dias JA. Etiologia das infecções intramamárias e contagem de células somáticas em vacas primíparas. *Semina Cienc Agrar.* 2002;23:3-8.
23. Zafalon LF, Amaral LA, Nader Filho A, Oliveira JV. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e estafilococos coagulase positivos e negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. *Rev Napgama.* 1999;6:4-6.

**Recebido em: 03/03/11**

**Aceito em: 22/05/12**

## DIAGNÓSTICO DE SITUAÇÃO DAS PRÁTICAS DE MANEJO SANITÁRIO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE BOVINOS DE CORTE

Fabrine Bigatão Pereira<sup>1\*</sup>  
Iveraldo dos Santos Dutra<sup>2</sup>

### RESUMO

Foram entrevistados 21 produtores rurais com o objetivo de avaliar quais as práticas de manejo sanitário adotadas nos sistemas de produção de bovinos de corte, em propriedades rurais localizadas no Estado de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rondônia. A pesquisa foi realizada por meio de abordagem qualitativa, com a colheita dos dados obtida por meio de questionário e entrevista pessoal junto aos proprietários rurais. Foram questionadas as atitudes e procedimentos sanitários correntes nesses sistemas de produção tais como: orientação veterinária, práticas sanitárias preventivas e de vigilância epidemiológica, conhecimento dos riscos sanitários para a produção segura de alimentos, alimentação dos animais, vacinas e vacinações, sistema de registros, medidas com os neonatos, produtos utilizados no ambiente e nos animais, período de carência, treinamento de funcionários, destino dos animais mortos, entre outras. Dentre os dados obtidos constatou-se que apenas 30% das propriedades possuíam assistência veterinária, 67% afirmaram respeitar o período de carência dos produtos, entretanto nenhum dos produtores soube mencionar estes períodos. Em 48% das propriedades eram os médicos veterinários que prescreviam medicamentos aos animais, dois proprietários relataram comprar e utilizar produtos veterinários vencidos nos animais e 48% já receberam algum tipo de treinamento na propriedade. Diante deste cenário, evidencia-se que os produtores rurais deveriam estar melhor preparados para inserção de seus produtos em um mercado altamente exigente e competitivo. Nesse contexto, agregar valor ao produto depende, sobretudo, da condição sanitária dos rebanhos.

**Palavras-chave:** pecuária de corte, risco sanitário, sanidade bovina, saúde pública, segurança alimentar.

### DIAGNOSIS OF SITUATION FOR PRACTICES IN HEALTH MANAGEMENT SYSTEMS FOR CATTLE PRODUCTION CUTTING

#### ABSTRACT

We interviewed 21 farmers in order to access which sanitary practices adopted in the production systems of beef cattle on farms located in São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul and Rondonia. The survey was conducted through a qualitative approach to the collection of data obtained through questionnaire and personal interview with the landowners. We questioned the attitudes and sanitation procedures in these current production systems such as veterinary assistance, preventive health practices and disease surveillance, knowledge of health hazards for the safe production of food, animal feed, vaccine and immunizations, registration system, measures with newborns, products used in the environment and animals, grace period, employee training, destination of the dead animals, among others. Along with

<sup>1\*</sup> Médica Veterinária Mestranda na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal. [fabrinebigatao@yahoo.com.br](mailto:fabrinebigatao@yahoo.com.br). Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Clóvis Pestana, 763 – Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP, CEP: 16050-680 - Brasil.

<sup>2</sup> Médico Veterinário Professor Adjunto do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal. [isdutra@fmva.unesp.br](mailto:isdutra@fmva.unesp.br). Curso de Medicina Veterinária, UNESP Universidade Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana, 763 – Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP, CEP: 16050-680 - Brasil.

the data found that only 30% of properties had veterinary care, 67% said they meet the expiration dates of the products, although it was not mentioned on the products if there were any. In only 48% of properties were veterinarians who prescribed drugs to animals. Only two of the owners confirmed buying and using expired products in animals and only 48% have received some training on the property. In this setting, it is evident that farmers should be better prepared for insertion of its products in a highly demanding and competitive market. In this context, add value to the product depends mainly on the condition of sanitation of the herds.

**Keywords:** beef cattle, health risk, bovine sanitation, public health, food security.

## DIAGNÓSTICO DE SITUACIÓN DE LAS PRÁCTICAS DE MANEJO SANITARIO EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE BOVINOS DE CARNE

### RESUMEN

Entrevistamos a 21 agricultores con el fin de evaluar las prácticas sanitarias adoptadas en los sistemas de producción de bovinos para carne en granjas ubicadas en los estados de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul y Rondonia. La investigación fue cualitativa y los datos fueron obtenidos mediante cuestionarios y entrevistas directas con los propietarios de las producciones rurales. Se analizaron las actitudes y los procedimientos de sanidad existentes en estos sistemas de producción tales como: la asistencia veterinaria, las prácticas de sanidad preventiva y vigilancia epidemiológica, el conocimiento de los riesgos sanitarios para la producción segura de alimentos, la nutrición de los animales, las vacunas e inmunizaciones, el sistema de registro, los cuidados neonatales, los productos utilizados en el medio ambiente y en los animales, fechas de caducidad, la capacitación de los empleados y el destino de los animales muertos, entre otros. Entre los datos colectados, se encontró que sólo el 30% de las granjas tenían asistencia veterinaria, el 67% dijo cumplir con el período de caducidad, aunque ningún de los propietarios supo mencionar dichos períodos. En el 48% de las granjas los veterinarios recetaban los medicamentos a los animales. Así mismo, dos propietarios notificaron la compra y uso de productos veterinarios caducados mientras que el 48% mencionó haber recibido algún tipo de entrenamiento en la propiedad. Con base en esto, es evidente que los productores deben estar mejor preparados para la introducción de sus productos en un mercado altamente exigente y competitivo. En este contexto, el valor agregado del producto depende principalmente de las condiciones sanitarias de los rebaños.

**Palabras clave:** bovinos de carne, riesgo para la salud, salud del ganado, salud pública, seguridad alimentaria.

### INTRODUÇÃO

A bovinocultura no Brasil tem significado econômico e social expressivo e destaca-se no cenário internacional pelo seu potencial de crescimento e pela magnitude de seu rebanho, estimado em 2007 em 199.752.014 cabeças (1). Em 2008 o Brasil liderou o “ranking” dos maiores exportadores de carne bovina no mundo, somando o volume de 2,2 milhões de toneladas equivalente a carcaça e receita cambial de US\$ 5,3 bilhões. Estes valores representaram uma participação de 28% do comércio internacional, com exportações para mais de 170 países (1).

Diante deste cenário, a expectativa geral é a de que os produtores rurais deveriam estar preparados para a inserção de seus produtos em um mercado altamente competitivo e exigente

não somente no âmbito interno como também externo. A segurança dos alimentos refere-se à garantia em consumir um alimento isento de resíduos prejudiciais à saúde do consumidor, sem perder de vista a lucratividade do produtor e as exigências da saúde e do bem estar animal (2). Para esse mercado em expansão, agregar valor ao produto depende, sobretudo, da condição sanitária dos rebanhos.

A aplicação de técnicas de criação e de manejo dos bovinos, proporcionando o bem-estar e saúde animal, é um grande desafio, pois exercem influência direta sobre o produto final. No entanto, pouco se conhece no meio rural da sua real dimensão e significado, uma vez que na maioria das vezes os produtores adotam práticas que trazem algum benefício econômico, visando apenas lucratividade, sem considerar os seus reflexos ambientais, na saúde animal e pública (3).

Diante da escassez de estudos sistemáticos no nosso meio e da necessidade de se descrever e analisar quais são as práticas sanitárias efetivamente adotadas em grandes propriedades rurais por meio de uma amostragem estabelecida por conveniência e pela aplicação de questionário estruturado, o presente estudo buscou realizar um diagnóstico de situação de quais são as práticas de manejo sanitário declaradamente empregadas em sistemas de produção extensivos de bovinos de corte.

## MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada nessa pesquisa visou a integração de níveis analíticos para a compreensão de procedimentos relacionados à atividade pecuária, às práticas de manejo e às orientações aos produtores (4). A pesquisa foi realizada por meio de abordagem qualitativa, com a colheita dos dados obtida por meio de questionário e entrevista pessoal junto aos proprietários rurais procurando-se obter informações sobre as práticas de manejo sanitário mais comuns declaradas.

Entre os meses de Julho e Outubro de 2009, foram entrevistados 21 produtores rurais, moradores de cidades localizadas no estado de São Paulo, cujas propriedades rurais estavam localizadas no estado de São Paulo - 7, Mato Grosso do Sul - 9, Mato Grosso - 4 e Rondônia - 1 e todas possuíam como atividade principal, a pecuária de corte.

O questionário estruturado continha perguntas gerais para o conhecimento sobre a atividade pecuária e específico para as práticas de manejo sanitário adotadas nos sistemas de produção, tais como: participação na lista de Estabelecimento Rural Aprovado no Sisbov (ERAS), área da propriedade, se possui atividade agrícola, efetivo de rebanho, finalidade da produção animal (cria, recria e terminação), se possui orientação médico veterinária, quais eram as medidas sanitárias preventivas e de vigilância epidemiológica, conhecimento dos riscos sanitários para a produção segura de alimentos, alimentação dos animais, vacinas e vacinações, vermifugação, medidas com os neonatos, cumprimento dos programas oficiais, produtos utilizados no ambiente e nos animais, observação do período de carência dos medicamentos, mortalidade animal, destino dos animais mortos, destino de embalagens, procedência da água de bebida dos animais, treinamento de funcionários e se possuía sistema de registros, número de funcionários, entre outras menos relacionadas ao objetivo da pesquisa.

## RESULTADOS

As propriedades rurais que possuíam como atividade econômica principal a pecuária de corte, em diferentes regiões do estado de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Rondônia, somavam 84.127 hectares, onde estavam empregados 266 trabalhadores. Nove (42,8%) dessas propriedades estavam inclusas na lista de propriedades ERAS. Por ocasião da entrevista, o efetivo de rebanho bovino nas propriedades era de aproximadamente 125.609 animais conforme mostra em detalhes a Tabela 1.

Tabela 1. Efetivo de rebanho, número de animais abatidos por ano e estabelecimentos rurais aprovados pelo Sisbov (ERAS) declarados pelos produtores rurais, tendo como referência os últimos 12 meses, no período de 2008 a 2009

Propriedade	Área (ha)	Estado	Efetivo Rebanho	Animais abatidos por ano	ERAS
F1	72	SP	9.000	18.500	Sim
F2	330	SP	2.900	1.300	Sim
F3	417,6	SP	400	300	-
F4	547,2	SP	1.100	1.500	-
F5	660	SP	3.500	2.000	-
F6	720	SP	2.000	2.000	Sim
F7	840	SP	1.322	1.500	-
F8	1.000	MS	2.400	800	Sim
F9	1.200	MS	3.000	2.000	Sim
F10	2.205	MS	3.664	2.000	-
F11	2.500	MS	2.500	1.500	Sim
F12	2.914	MS	1.363	400	-
F13	3.500	MS	4.730	3.000	-
F14	4.080	MS	2.400	1.400	-
F15	4.200	MS	4.500	1.500	Sim
F16	6.750	MT	7.000	2.500	Sim
F17	7.700	MT	3.270	1.200	Sim
F18	8.500	MS	33.000	6.000	-
F19	9.000	RO	16.000	9.000	-
F20	13.000	MT	15.000	5.000	-
F21	13.992	MT	6.560	2.000	-
Total	84.127,8	--	125.609	65.400	9

Doze dos 21 (57,1%) pecuaristas declararam ter iniciado a atividade no período dos anos 1950 a 1970, oito dos 21 (38,1%), nas décadas de 1980 e 1990 e apenas um (4,76%) iniciou em 2001. Todos os produtores disseram comercializar seus produtos para frigoríficos de exportação e relataram que nos abates em geral, a taxa de condenação de carcaça por cisticercose, era de até 1% em 15 (71,4%) propriedades, de até 2% em duas (9,52%), de até 5% em uma (4,76%) e não existiu relato de condenação por cisticercose em duas (9,52%) das propriedades.

O consumo de leite produzido nas propriedades foi uma prática relatada por 18 dos 21 (85,7%) proprietários, enquanto, o consumo de carne oriunda do abate de animais nos sistemas de produção foi relatado em nove (42,8%) propriedades.

Enquanto seis dos 21 (28,5%) proprietários declararam possuir assistência veterinária permanente (três estavam ligadas a reprodução), 14 (66,6%) relataram buscar assistência veterinária apenas em situações de emergência sanitária, após tentativa de tratamento e um (4,76%) relatou não possuir assistência veterinária nenhuma.

Seis dos 21 (28,5%) pecuaristas declararam que as doenças que acometiam os animais eram identificadas pelo médico veterinário, três (14,2%) pecuaristas relataram serem eles próprios quem identificava, quatro (19,0%) disseram serem os funcionários e oito (38,1%) declararam ser o médico veterinário junto com o proprietário e/ou o funcionário. O tratamento das enfermidades era prescrito por médico veterinário, conforme o relato de dez (47,6%) proprietários, enquanto em duas (9,52%) era prescrito pelo proprietário, em quatro (19,0%) pelos funcionários e em cinco (23,8%) eram os funcionários junto aos proprietários que

determinavam o tratamento. Quatorze (66,6%) proprietários disseram respeitarem o período de carência dos medicamentos.

Dez (47,6%) produtores relataram a ocorrência de algum tipo de treinamento para os funcionários das propriedades, e segundo os mesmos, seis (28,5%) foram de empresas de medicamentos veterinários, dois (9,52%) foram ministrados por médico veterinário; em uma (4,76%) propriedade tratava-se de inseminação artificial e noutra (4,76%) de reciclagem.

O registro de dados escriturados das propriedades e dos animais foi declarado existente por todos os proprietários (100%), computadorizados ou manuscritos. Apenas as propriedades ERAS possuíam dados mais completos de registro como: nascimento, estoque, movimentação, manejo sanitário, insumos comprados e mortalidade.

A prática da vacinação contra febre aftosa, brucelose (fazendas de cria) e carbúnculo sintomático foi relatada por 100% dos proprietários. Já a vacinação contra o botulismo foi relatada por 15 (71,4%) proprietários. Dezoito (85,7%) produtores relataram que eles próprios elaboraram o programa de vacinação, enquanto apenas três (14,2%) foram elaborados por médicos veterinários.

Em relação à higienização de equipamentos utilizados na aplicação de produtos veterinários, 19 (90,4%) proprietários disseram realizar esta prática por meio de lavagem com água, com iodo ou fervura das agulhas após a vacinação, somente 14 (66,6%) disseram trocar as agulhas durante a vacinação e apenas um (4,76%) relatou o uso de proteção individual (luvas).

Na prática das vacinações, 16 (76,1%) produtores alegaram que os próprios funcionários aplicavam os produtos nos animais e cinco (23,8%) afirmaram ser os proprietários. Em 11 (52,3%) propriedades foi relatado que os funcionários aplicavam a vacina de brucelose, enquanto em apenas uma (4,76%) propriedade era o médico veterinário quem aplicava; em quatro (19,0%) propriedades foi relatado que um médico veterinário credenciado para realização da vacina de brucelose apenas acompanhava o procedimento.

Para conservação das vacinas, 12 (57,1%) proprietários relataram possuir geladeiras exclusivas para conservação das mesmas, dois (9,52%) disseram conservá-las em gelo e aplicar em um ou dois dias; sete (33,3%) disseram comprar e aplicar as vacinas no mesmo dia sem estocá-las, porém, as restantes eram conservadas em geladeira de uso doméstico.

Dezoito (85,7%) produtores declararam ser eles próprios os elaboradores do programa de vermifugação, apenas dois (9,52%) relataram ter sido elaborado por médicos veterinários junto aos proprietários e um (4,76%) produtor declarou não fazer nenhum tipo de vermifugação nos seus animais. Os critérios utilizados pelos entrevistados para compra de produtos veterinários eram preço e qualidade, além de conhecimento do laboratório fabricante. Dois (9,52%) produtores relataram comprar produto recém-vencido, devido ao seu valor amplamente reduzido.

O problema sanitário referente a diarreia em bezerros foi exposto por 12 (57,1%) produtores, porém, nenhum produtor possuía conhecimento da causa da diarreia. A maior taxa de mortalidade relatada foi de bezerros com menos de três meses de idade, atingindo até 5%.

Em relação ao conhecimento das doenças contempladas nos programas oficiais, 13 (61,9%) produtores relataram já ter visto bovinos acometidos pela febre aftosa e saberiam reconhecer a doença, oito (38,1%) declararam nunca ter visto, mas disseram saber reconhecer a enfermidade. Em caso de suspeita de febre aftosa no rebanho, 13 (61,9%) criadores disseram que desapareceriam com o animal, dois (9,52%) disseram que tratariam, um (4,76%) declarou que comunicaria o médico veterinário e cinco (23,8%) não responderam.

Dez (47,6%) produtores disseram já ter realizado levantamento sorológico para brucelose nas propriedades, portanto conheciam a situação da doença no rebanho. Treze (61,9%) disseram saber reconhecer as conseqüências da doença e quatro (19,0%) produtores relataram conhecer alguém que contraiu a doença. Nenhum produtor conhecia o PNCEBT,

muito menos à certificação de propriedades livres ou monitoradas para brucelose e tuberculose.

Tendo em consideração a raiva e outras encefalopatias, 12 (57,1%) produtores relataram já ter ocorrido caso de doença com sintomatologia nervosa nas propriedades. Desses 12, em seis (50%) propriedades, os casos que ocorreram foram diagnosticados por exame clínico ou laboratorial. O ataque de morcegos nas propriedades foi relatado por cinco (23,8%) proprietários, três (14,2%) destes cinco, declararam já ter utilizado pasta vampiricida, e apenas três (14,2%), destas cinco, comunicaram o fato à Defesa Sanitária Animal (DSA).

Dezenove (90,4%) produtores declararam que suas propriedades possuíam córregos ou rios que passavam em outras propriedades ou cidades. Apenas um (4,76%) proprietário relatou possuir pastos irrigados e 16 (76,1%) disseram que possuíam agricultura na vizinhança.

A realização da integração de agricultura e pecuária foi mencionada por nove (42,8%) proprietários. Onze (52,3%) produtores disseram comprar subprodutos agrícolas para alimentação dos animais e declararam conhecer a procedência desses insumos.

De acordo com os produtores rurais, a mortalidade de animais adultos não ultrapassou 1% em nenhuma propriedade. No entanto, a principal causa de morte relatada em quatorze (66,6%) das propriedades foi acidental. Raio e acidente ofídico foram as causas seguintes relatadas por 10 (47,6%) proprietários; quatro (19,0%) produtores declararam que já encontravam o animal morto; dois (9,52%) relataram a pneumonia como principal causa de morte, um (4,76%) produtor relatou ser verminose a principal causa, outro (4,76%) disse ser o timpanismo e um (4,76%) declarou ser carbúnculo sintomático a principal causa de morte na propriedade.

Com relação ao destino destes cadáveres, seis (28,5%) proprietários disseram enterrar o cadáver no local onde morreu, quatro (19,0%) disseram retirar o animal e enterrar em outro local, quatro (19,0%) declararam não recolher os cadáveres, três (14,2%) disseram retirar o cadáver do local onde morreu e incinerar, dois (9,52%) disseram levar os animais para o cemitério da propriedade e um (4,76%) declarou que posteriormente recolhia apenas os ossos dos animais.

Quatro (19,0%) produtores relataram a existência de pulverização aérea nas proximidades das propriedades, um (4,76%) disse não ter conhecimento sobre essa informação e 16 (76,1%) proprietários declararam não existir.

Com relação ao destino das embalagens agrícolas, 10 (47,6%) proprietários declararam devolver as mesmas, cinco (23,8%) disseram não utilizar estes produtos e seis (28,5%) disseram queimar ou enterrar essas embalagens.

O uso de cama de frango na alimentação dos animais foi relatado por três (14,2%) produtores como uma prática já utilizada em suas propriedades, no entanto, estes mesmos produtores afirmaram que não utilizam mais. Por outro lado, cinco (23,8%) proprietários relataram que conheciam outros produtores que ainda utilizavam desta prática.

Em relação aos cuidados com meio ambiente e situação de risco sanitário, oito (38,1%) proprietários disseram possuir banheiros nos currais e sete (33,3%) proprietários disseram receber visitas de pescadores, cerqueiros e/ou cortadores de cana.

O abate de bovinos para consumo próprio foi relatado como sendo prática comum por todos os proprietários. Dez (47,6%) desses proprietários afirmaram abater apenas bovinos acidentados para o consumo e um (4,76%) relatou vender estes animais.

A incineração do lixo doméstico gerado na propriedade foi relatada como sendo rotineira por 12 (57,1%) entrevistados, enquanto seis (28,5%) afirmaram possuir um local para sua deposição, dois (9,52%) disseram enterrar este lixo e um (4,76%) relatou levar estes resíduos gerados na propriedade para o lixão da cidade.

Quanto ao destino de produtos veterinários fora do prazo de validade, 15 (71,4%) produtores relataram que eram todos utilizados antes do vencimento; dois (9,52%) produtores

disseram devolver estes produtos para a empresa onde eles eram adquiridos, dois (9,52%) relataram enviar para o depósito de lixo da propriedade e dois (9,52%) declararam utilizar esses produtos vencidos.

O destino das agulhas descartadas foi o lixo comum em 19 (90,4%) propriedades rurais, conforme relatado pelos produtores, enquanto outros dois (9,52%) produtores declararam devolver essas agulhas nas revendas de produtos veterinários.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No desenvolvimento deste trabalho utilizou-se a abordagem qualitativa, pois este procedimento metodológico abriga várias técnicas que procuram descrever e traduzir a questão principal, promovendo o entendimento do problema. O método qualitativo é mais direcionado à compreensão dos fatos do que a mensuração dos fenômenos (5).

O diagnóstico de situação realizado nessa pesquisa revelou pontos preocupantes em relação à saúde não apenas do rebanho bovino, mas também à população humana. A escassez de assistência técnica nas propriedades certamente agrava ainda mais o uso indiscriminado de medicamentos veterinários, que em grande parte das propriedades foram decididos pelos próprios funcionários e proprietários. A inexistência de legislação sobre a questão da livre comercialização de produtos veterinários e a ausência de assistência técnica são situações que colocam em risco a saúde tanto dos animais quanto dos seres humanos. Acrescenta-se a estas declarações, o fato de que os produtores de carne bovina mesmo dizendo respeitar o período de carência dos medicamentos, não souberam citar ao menos o período de dois produtos.

O fato de a maioria das propriedades rurais não ter assistência veterinária permanente e, portanto não recorrer ao diagnóstico laboratorial, geram dados oficiais de vigilância epidemiológica que estão muito aquém da realidade, com subnotificações que não refletem o que ocorre no campo (6).

Todos os produtores relataram a vacinação contra a febre aftosa como prática regular e a maioria deles relatou ter visto bovinos acometidos pela doença, portanto, poderia reconhecê-la. Esta maioria, também declarou desaparecer com animais suspeitos de febre aftosa no rebanho, demonstrando que a notificação da febre aftosa não está esclarecida para os produtores rurais. Isso se dá por falhas de educação sanitária destes produtores, que estão na atividade há pelo menos 30 anos, dificultando à mudança de mentalidade.

Pode-se constatar que a vacinação contra a brucelose também é uma medida regular em todas as propriedades que exploram a cria de animais, provavelmente devido à obrigatoriedade desta prática. No entanto, pode-se também depreender que nenhum dos produtores entrevistados possuía informação sobre a existência da certificação de propriedades livres ou monitoradas. Isso revela que enquanto a vacinação compulsória contra a brucelose vai se tornando uma prática sanitária regular, os reais benefícios do processo de certificação, ainda não foram apropriadamente divulgados aos produtores pelas autoridades sanitárias.

Dos produtores que relataram a ocorrência de doença com sintomatologia nervosa nas propriedades, apenas metade enviou material para diagnóstico laboratorial. A falta de diagnóstico das mortes por sintomas nervosos é um grande problema quando se diz respeito à Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), pois a ausência de diagnóstico dessas mortes reduz a credibilidade ao afirmar a ausência de EEB no Brasil. Em relação aos ataques de morcegos, a escassez de comunicação aos órgãos oficiais da defesa sanitária animal também decorre do desconhecimento dos produtores em relação à recomendação de notificação.

Um modelo de rastreabilidade que permite saber quais atitudes estão sendo aplicadas da porteira para dentro, ou seja, um sistema baseado na harmonização, transparência e equivalência, é uma forma de registros que deveria existir em todas as propriedades rurais (7).

Nas propriedades que foram objetos dessa pesquisa, somente aquelas certificadas pelo Sisbov (43%), possuíam registros de informações completos e necessários.

O investimento no treinamento dos trabalhadores que lidam com os animais, em questão de higienização de equipamentos, de manejo correto do gado, além de esclarecimento aos produtores rurais sobre a real dimensão e significado dos riscos sanitários existentes, não somente para saúde dos animais, mas para saúde da população humana, seria o ponto chave para o início de uma mudança de mentalidade e atitude. A adoção de práticas que trazem benefícios econômicos, visando só lucratividade sem considerar os reflexos ambientais, na saúde animal e pública, como citado por Spears (3), foi a realidade encontrada neste levantamento.

Questões como o uso descontrolado de medicamentos e observação do período de carência, ações de vigilância das doenças de sintomatologia nervosa, retirada dos cadáveres dos pastos com sua destruição, anotações sobre produtos farmacêuticos utilizados, procedimentos adotados e mortalidade, são questões essenciais e devem ser objetivamente definidas (8).

O número de animais encontrados mortos nos pastos, os animais mortos por mordida de cobra, as mortes por sintomatologia nervosa que não obtiveram diagnósticos, e o destino destes cadáveres, que em 52% das propriedades ficam nos pastos, são dados preocupantes que possibilitam grandes riscos à saúde animal e pública, além de se constituírem em restrições que são impostas pelos países importadores da carne brasileira.

Segundo as diretrizes européias, a rastreabilidade perde todo sentido quando cadáveres de animais mortos, geralmente por causas desconhecidas ou não devidamente diagnosticadas, são encontrados no pasto (9). Fato preocupante ainda é que inexiste na legislação brasileira qualquer menção no sentido do destino a ser dado aos animais mortos nas propriedades (10).

Obviamente não é possível reduzir a zero o risco sanitário, entretanto, por menor que este seja, é sempre grave para quem é acometido (11). Este é um desafio para os países em desenvolvimento e em especial para o Brasil na sua condição atual e futura (6).

Uma grande dificuldade observada é a resistência dos produtores a mudanças. Talvez por estarem na atividade pecuária há muitos anos e julgarem obter um bom desempenho na área até os dias de hoje, esses pecuaristas resistem a mudanças, inovações e novas opiniões.

A partir dos resultados do presente estudo, pode-se concluir que apesar do grande avanço do Brasil em vários indicadores produtivos e sanitários, ainda são necessários entendimento e atitude dos produtores quanto ao manejo sanitário, controle de risco, saúde animal, meio ambiente, gestão de pessoas e qualidade da carne como alimento. O esclarecimento aos produtores, de como produzir um alimento seguro e como agregar valor ao seu produto depende, sobretudo, dos serviços de saúde animal, de ação governamental, do investimento em treinamento de trabalhadores rurais e de o diagnóstico tornar-se uma prática corrente nas propriedades. Estas ações são elementares para mudança de cenário, de atitude e principalmente à proporção do bem-estar animal e público.

## REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Sanidade animal. São Paulo; 2009 [acesso em 2009 Out 16]. Disponível em: [http://www.abiec.com.br/3\\_sanidade.asp](http://www.abiec.com.br/3_sanidade.asp)
2. Machado JGCF, Nantes JFD. A visão institucional do processo de rastreabilidade da carne bovina. Segurança dos alimentos e rastreabilidade: o caso da carne bovina no Brasil. In: Batalha MO. Gestão do agronegócio. São Carlos: Edufscar; 2005.

3. Spears EE. Qualidade e segurança em alimentos. In: Zylbertztajn D, Neves MF. Economia e gestão dos negócios agroalimentares. São Paulo: Thomson Pioneira; 2000. p.428.
4. Porro R, Mesquita BA, Santos IJP. Expansão e trajetórias da pecuária na Amazônia. Brasília: Ed. Universidade de Brasília; 2004.
5. Yin RK. Case study research: design and methods. 2ª ed. London: Sage; 1994.
6. Dutra IS. Medicina veterinária preventiva como instrumento para segurança alimentar e nutricional sustentável. In: Anais do 5º Simpósio de Produção de Gado de Corte; 2006, Viçosa. Viçosa, Minas Gerais: Suprema Gráfica e Editora Ltda; 2006. v.1, p.543-53.
7. Serviço de Rastreabilidade da Cadeia Produtiva de Bovinos e Bubalinos. SISBOV. Cartilha do novo serviço de rastreabilidade da cadeia produtiva de bovinos e bubalinos. Brasília: SDC/ABIEC/CNA/ACERTA; 2006.
8. Dutra IS. Proposta preliminar para a implantação de um sistema de certificação sanitária de propriedades rurais produtoras de carne bovina e bubalina e de leite. Araçatuba: Unesp; 2007.
9. Comissão das Comunidades Européias. Documento 301R0999. Regulamento do Parlamento Europeu e do Conselho, de maio de 2001, que estabelece regras para prevenção, e o controle e a erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis. Jornal Oficial, n. L 147, 2001 Maio 31. p.1-40.
10. Dutra IS. Epidemiologia, quadro clínico e diagnóstico, pela soroneutralização em camundongo, do botulismo em bovinos no Brasil [tese]. Araçatuba: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista; 2001.
11. Soares CM. Algumas reflexões sobre segurança alimentar. Indústria da Carne n.2; maio/junho. São João de Deus – Lisboa: Associação Nacional dos Industriais de Carne; 2000.

**Recebido em: 02/09/10**

**Aceito em: 27/06/12**

## AVALIAÇÃO DO EMPREGO DO PROTOCOLO OVSYNCH MODIFICADO NA TAXA DE PREENHEZ E MORTALIDADE FETAL EM *BUBALUS BUBALIS*

Romildo Romualdo Weiss<sup>1</sup>  
Fernando Pansera Dalla Costa<sup>1</sup>  
Luciana Ferri Frares<sup>1</sup>  
Luiz Ernandes Kozicki<sup>2</sup>  
Priscilla R Muradás<sup>2</sup>  
Renata A Abreu<sup>2</sup>

### RESUMO

O experimento objetivou, avaliar a utilização do hormônio luteinizante (LH) e da gonadotrofina coriônica humana (hCG), em substituição ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no protocolo ovsynch em fêmeas bubalinas, visando à inseminação artificial em tempo fixo (IATF), verificar a influência do escore da condição corporal (ECC) sobre as taxas de prenhez de cada grupo e avaliar a taxa geral de mortalidade fetal. Empregou-se o protocolo Ovsynch tradicional no Grupo 1 (G1) com modificações no G2 e no G3, (D0=GnRH, D7=PGF2 $\alpha$  e D9= GnRH, hCG ou LH respectivamente), para sincronizar o estro de 106 búfalas das raças Murrah e Mediterrâneo, durante a estação reprodutiva de 2008. No D9 do protocolo os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos e receberam: GnRH (G1)-(acetato de lecirelina 25 $\mu$ g, n=38); hCG (G2) - (2500 UI, n=35) ou LH (G3) - (12,5 mg, n=33). Após 16 horas (D9 + 16 horas), realizou-se a IATF e mensurou-se o diâmetro do folículo pré-ovulatório com exames ultrassonográficos. O diagnóstico de gestação foi efetuado no 43º dia após a IATF, e repetido no 61º dia, visando verificar a taxa de mortalidade fetal. As taxas de concepção entre os grupos GnRH, hCG e LH, foram respectivamente: 39,4, 51,4 e 45,5% (p>0,05); a ultrassonografia feita no dia da IATF revelou que 90,4% dos animais possuíam folículos pré-ovulatórios de 11,9 mm de diâmetro médio nos ovários; os grupos hCG e LH tiveram maior taxa de prenhez que o grupo GnRH (p>0,05). A taxa de mortalidade fetal foi de 6,25%. Ao se comparar o ECC com as taxas de prenhez nos grupos G1, G2 e G3, não se observou diferença (p>0,05). Conclui-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados e que a taxa de mortalidade fetal pode ser reduzida com a melhora do ECC dos animais.

**Palavras-chave:** *Bubalus bubalis*, ovsynch, folículo pré-ovulatório, mortalidade embrionária, escore da condição corporal, inseminação artificial em tempo fixo.

## AVALIATION OF EMPLOYING THE MODIFIED OVSYNCH PROTOCOL ON PREGNANCY RATE AND FETAL MORTALITY IN *BUBALUS BUBALIS*

### ABSTRACT

This experiment aimed to evaluate the use of luteinizing hormone (LH) and human chorionic gonadotropin (hCG) in replacement to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in estrus synchronization protocols in female buffalo, in order to artificial insemination at fixed time (TAI), verify the influence of body condition score (BCS), on pregnancy rates of each group and assess the overall rate of fetal mortality. We used the traditional Ovsynch protocol in

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária, UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária, PUC-PR, Curitiba, PR, Brasil.

Group 1 (G1) with modifications in G2 and G3 (GnRH = D0, D7 = D9 = PGF2 and GnRH, hCG or LH, respectively), to synchronize estrus of 106 buffaloes of Murrah and Mediterranean during the breeding season of 2008. In D9 protocol the animals were randomly divided into three groups and received: GnRH (G1) - (lecirelin acetate 25µg, n = 38), hCG (G2) - (2500 IU, n = 35) or LH (G3) - (12.5 mg, n = 33). After 16 hours (16 hours + D9), held on TAI and measured the diameter of the preovulatory follicle with ultrasound examinations. Pregnancy diagnosis was performed on day 43 after TAI, and repeated on day 61 in order to check the fetal mortality rate. The conception rates between the groups GnRH, hCG and LH, were respectively: 39.4, 51.4 and 45.5% ( $p > 0.05$ ); ultrasound done on the day of TAI revealed that 90.4% of animals had pre-ovulatory follicles of 11.9 mm in diameter in the ovaries, hCG and LH groups had a higher pregnancy rate than the GnRH group ( $p > 0.05$ ). The fetal mortality rate was 6.25%. Comparing the ECC with pregnancy rates in G1, G2 and G3, there was no difference ( $p > 0.05$ ). It is concluded that there was no significant difference between treatments and that the fetal mortality rate can be reduced with the improvement of ECC animals.

**Keywords:** *Bubalus bubalis*, artificial insemination fixed time, estrus synchronization, preovulatory follicle diameter, embryonic mortality rate.

## EVALUACIÓN DEL USO DEL PROTOCOLO OVSYNCH MODIFICADO EN EL ÍNDICE DE CONCEPCIÓN Y LA MORTALIDAD FETAL EM *BUBALUS BUBALIS*

### RESUMEN

El experimento tuvo como objetivo evaluar el uso de la hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica humana (hCG), en sustitución de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el Ovsynch en búfalas, con miras a una inseminación artificial de tiempo fijo (IATF), verificar la influencia de la condición corporal (CC) en las tasas de embarazo de cada grupo y evaluar la tasa global de mortalidad fetal. Se utilizó el protocolo Ovsynch tradicional en el Grupo 1 (G1) con modificaciones en G2 y G3 (GnRH = D0, D7 = D9 = PGF2 y GnRH, hCG o LH, respectivamente), para sincronizar el estro de 106 búfalos de las razas Murrah y Mediterráneo durante la temporada de cría de 2008. En el D9 del protocolo, los animales fueron divididos aleatoriamente en tres grupos y sometidos a: GnRH (G1) - (etil lecorelina 25µg, n = 38), la hCG (G2) - (2500 UI, n = 35) o LH (G3) - 12,5 mg, n = 33). Después de 16 horas (16 horas + D9), se realizó el TAI y se midió el diámetro del folículo pre-ovulatorio con ultrasonido. El diagnóstico de gestación se llevó a cabo el día 43 después de la IATF, y se repitió el día 61 con el fin de comprobar la tasa de mortalidad fetal. Las tasas de concepción entre los grupos de la GnRH, hCG y LH, fueron respectivamente: 39,4, 51,4 y 45,5% ( $p > 0,05$ ); la ecografía realizada en el día de la IATF puso de manifiesto que el 90,4% de animales tenía folículos pre-ovulatorios de 11,9 mm de diámetro en los ovarios. Los grupos hCG y LH tuvieron una tasa de embarazo más alta que el grupo de GnRH ( $p > 0,05$ ). La tasa de mortalidad fetal fue de 6,25%. Al comparar la ECC con las tasas de embarazo en G1, G2 y G3, no hubo diferencia ( $p > 0,05$ ). Se concluye que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y que la tasa de mortalidad fetal se puede reducir con la una mejoría de la condición corporal de los animales.

**Palabras clave:** *Bubalus bubalis*, ovsynch, folículo pre-ovulatorio, mortalidad fetal, puntuación de la condición corporal, inseminación artificial en tiempo fijo, sincronización del estro.

## INTRODUÇÃO

O rebanho bubalino brasileiro tem uma taxa média de crescimento anual de 12,5%, alcançando em torno de dois milhões de cabeças no país (1). A produção de leite desta espécie aumentou 28,3%, e a bubalinocultura é responsável por 12,4% da produção mundial de leite (1). A região Sul apresenta o 2º maior rebanho nacional, destacando-se o Paraná na produção de carne e derivados lácteos (2).

A utilização de protocolos que não necessitem de identificação de estro para a realização da IATF, contribuiu bastante para o incremento da utilização desta biotécnica no rebanho bubalino.

Pursley et al. (3), utilizando o protocolo Ovsynch em fêmeas bovinas verificaram que todos os animais haviam ovulado entre 24 e 32 horas após a aplicação da segunda dose de GnRH. Em fêmeas bubalinas, Paul e Prakash (4) verificaram que após a segunda aplicação de GnRH a ovulação ocorreu entre 20 e 32 horas, incidindo a maior ocorrência de ovulação às 23,3 horas. Uma vez conhecido o momento da ovulação, foram realizados experimentos para determinar o melhor período para se realizar a inseminação artificial. Diferentes períodos foram estudados (0, 8, 16, 24 e 32 horas), sendo que as melhores taxas de concepção foram obtidas, quando a IA foi realizada às 16:00 horas após a segunda dose de GnRH no protocolo Ovsynch (5-7).

O objetivo do experimento foi avaliar a substituição do hormônio liberador das gonadotrofinas do protocolo Ovsynch pelo hormônio luteinizante ou pela gonadotrofina coriônica humana sobre a taxa de prenhez, mortalidade fetal e o escore corporal em *Bubalus bubalis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em 2008. Foram utilizadas 106 fêmeas bubalinas das raças Murrah e Mediterrâneo do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR - Morretes - PR), em regime semi-estabulado, com peso médio dos animais de 470 kg, idade entre quatro e dez anos e pós-parto de 45 dias. Os animais estavam no período de lactação sendo a produção média de 4,0 litros/animal/dia. A alimentação dos animais era composta por *Brachiaria mutica*, *Brachiaria radicans*, *Brachiaria humidicola*, *Axonopus spp*, *Paspalum spp*, *Hemarthria altiússima* ao pastoreio; e quando estabuladas recebiam *Pennisetum purpureum* e *Saccharum officinarum* picadas e levadas ao cocho (cerca de 35 kg/cabeça/dia) e 2 kg/cabeça/dia de milho moído com minerais. Realizou-se a avaliação do escore de condição corporal (ECC), baseando-se nos critérios de Edmonson et al. (8). Ao todo 81 animais estavam com o ECC na condição de  $\leq 3,0$  e 25 com  $\text{ECC} \geq 3,0$ .

Os hormônios utilizados nos protocolos foram: o acetato de busarelina (Gestran Plus®, Tecnopec); d-cloprostenol (Ciosin®, Intervet Schering-Plough); gonadotrofina coriônica humana (Novolin®, Novo Nordisk) e hormônio luteinizante (Lutropin®, Tecnopec).

Os animais foram divididos ao acaso em três grupos: G1 (n=38), G2 (n=35) e G3 (n=33) e receberam os seguintes tratamentos:

### Grupo 1: (Ovsynch ou controle)

D0-----D7-----D9---+16 h---D10			
GnRH	PGF2 $\alpha$	GnRH	IATF
Acetato de Lecirelina	D-cloprostenol	25 $\mu$ g	
50 $\mu$ g	0,150 mg		



Tabela 1. Taxa de concepção em fêmeas bubalinas das raças Murrah e Mediterrâneo, submetidas à inseminação artificial em tempo fixo mediante os protocolos Ovsynch tradicional (G1) e os modificados (G2 e G3), n=106, 2008.

Grupo	Número de animais (n)	Taxa de concepção (%)
G1	38	39,4 <sup>a</sup>
G2	35	51,4 <sup>a</sup>
G3	33	45,5 <sup>a</sup>

Letras iguais na mesma coluna não são significantes

Os dados da Tabela 1 indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos, porém observou-se uma tendência de melhores resultados no grupo de búfalas que receberam o protocolo com o hCG (G2) em relação ao grupo que recebeu GnRH (G1). Tais resultados são muito semelhantes àqueles obtidos por Carvalho et al. (11), os quais compararam a taxa de concepção de animais que receberam GnRH ou hCG no protocolo Ovsynch. Estes pesquisadores obtiveram taxa de concepção de 46,8% e 50,8%, respectivamente ( $P>0,07$ ), evidenciando vantagens ao se administrar o HCG, no protocolo ovsynch modificado. Ao se comparar a taxa de concepção entre os grupos GnRH e LH, os dados encontrados na presente pesquisa são discordantes aos obtidos por Baruselli (12), ao compararem a taxa de concepção destes tratamentos, quando verificaram vantagens significativas ( $p<0,05$ ) ao se empregar o LH, em substituição ao GnRH (taxas de concepção de 46,49% e 65,24%, respectivamente). Os resultados diferentes podem ter sido influenciados pelo número de animais por grupo e/ou dosagem hormonal utilizada. Contudo os dados do presente experimento são semelhantes aos reportados por outros autores (4, 13, 14), ao enfatizarem melhorias na sincronização da ovulação utilizando estes hormônios.

Neste estudo, ao se comparar a associação entre os protocolos de sincronização da ovulação (GnRH, hCG e LH) e a probabilidade de concepção dentro de cada nível de ECC ( $>3$  ou  $\leq 3$ ), não se verificou diferença significativa de resultados (Figura 1).

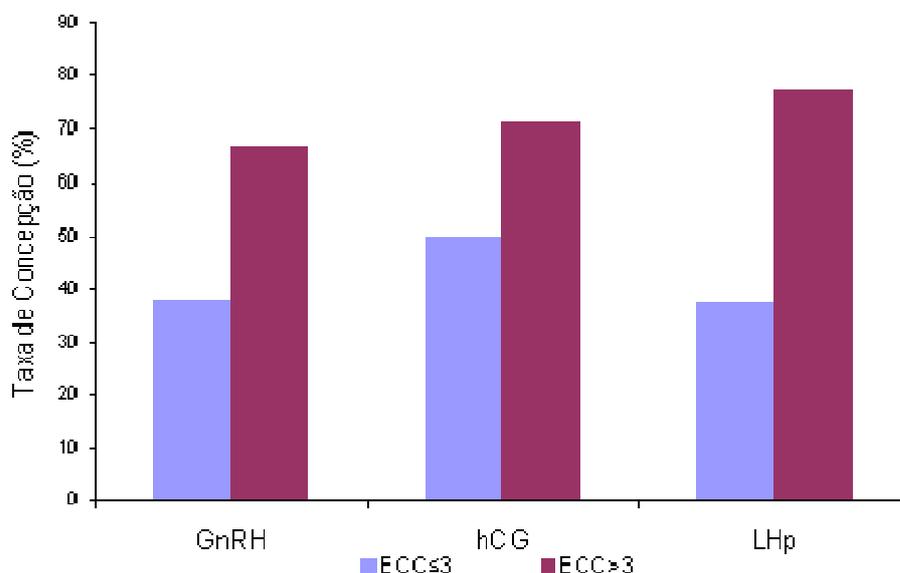


Figura 1. Taxa de concepção em *Bubalus bubalis* em função dos níveis de ECC ( $>3$  com  $p=0,56$  ou  $\leq 3$  com  $p=1,00$ ) dos animais para cada protocolo de sincronização utilizado.

Não houve diferença significativa entre os escores corporais ( $p>0,05$ ).

Considerando os resultados do experimento e aplicando-se a regressão logística, quantificou-se a influência do ECC sobre a taxa de concepção (Figura 2). Foi possível

observar que, em função do aumento de uma unidade no valor do ECC, (média), houve aumento médio de 24,3 % sobre a taxa de concepção,  $(21,3 + 30,0 + 21,6)/3=24,3$  (%). Observa-se ainda que o maior aumento (30%) foi proporcionado por valores de ECC entre 2,5 e 3,5.

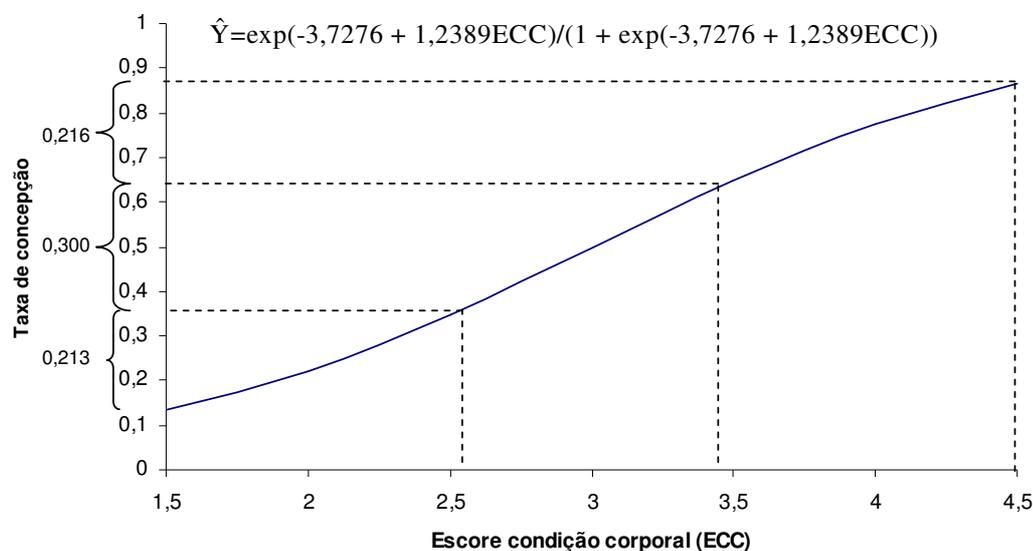


Figura 2. Curva estimada com vistas à descrição da relação entre o escore da condição corporal e a taxa de concepção por meio da técnica de regressão logística.

Os dados do presente estudo corroboram os relatos de Baruselli et al. (15), ao observarem a influência ( $p < 0,05$ ) do ECC sobre a taxa de concepção ( $\leq 3,0 = 31,4\%$ ,  $n=223$ ;  $3,5 = 52,9\%$ ,  $n=546$ ;  $\geq 4,0 = 57,1\%$ ,  $n=198$ ), ao pesquisarem fêmeas bubalinas no Vale do Ribeira (SP). Os exames de ultrassonografia transretal antes da IATF revelaram, na presente pesquisa, que 90,4% dos animais possuíam folículos com diâmetro  $\geq 1,0$  cm nos ovários, indicando sincronização de estro. O folículo pré-ovulatório possuía em média  $1,19 \pm 0,14$  cm de diâmetro. Os dados de diâmetro de folículo pré-ovulatório ou do dominante e de corpo lúteo em cada grupo encontram-se na Tabela 2. Estes dados são semelhantes aos obtidos por Campanile et al. (14), onde 86,7% dos animais apresentaram folículos com diâmetro superior a 1,0 cm no momento da IATF. Sartori, Rosa e Wiltbank (16), ao administrarem LH exógeno, demonstraram que somente folículos com mais de 0,85 cm possuíam capacidade ovulatória. Estes autores sugeriram que a expressão de receptores para LH ocorre apenas em folículos com mais de 0,8 cm, demonstrando que folículos menores são incapazes de ovular, mesmo após receberem altas doses de LH exógeno. Por esse motivo calcula-se que a taxa de sincronização de estro, baseia-se no número de animais que possuem folículos com capacidade ovulatória, ou seja, maiores que nove mm. Neste experimento a taxa de sincronização foi satisfatória (90,4%).

A utilização de GnRH, hCG e/ou LH no dia 9 do protocolo teve como objetivo promover a indução sincronizada da ovulação do folículo dominante ( $> 0,9$  cm) pelo efeito fisiológico de estimular a liberação de LH e FSH na hipófise anterior. Essa sincronização permite melhores resultados quanto à taxa de prenhez quando comparada com outros protocolos que não incluem a utilização de indutores da ovulação.

Tabela 2. Diâmetro médio do folículo dominante (FD) no dia da inseminação artificial em tempo fixo e do corpo lúteo (CL) nas búfalas gestantes no 43º dia.

Grupo	Número de animais (n)	Diâmetro médio do FD (cm) na IATF	Diâmetro médio do CL (cm) no 43º dia de prenhez
G1	14	1,13	2,19
G2	18	1,22	2,17
G3	15	1,25	2,15

Na presente pesquisa objetivou-se igualmente verificar a taxa de perdas embrionárias entre o 43º e o 61º dia após a IATF, obtendo-se a cifra de 6,25%, constando os dados individuais dos animais na Tabela 3. Campanile et al. (14), obtiveram percentual de perda embrionária muito próxima a da presente pesquisa (7%) em búfalas inseminadas após a sincronização de estro. Esses mesmos autores utilizaram o GnRH e o HCG em diferentes tratamentos de sincronização de estro, verificando que os animais que haviam recebido HCG, demonstraram maiores concentrações de progesterona (386 pg/ml) em relação aos animais que haviam recebido GnRH (344 pg/ml), não observando contudo, redução das perdas embrionárias.

Tabela 3. Dados dos folículos pré-ovulatórios e de corpo lúteo em animais que tiveram perda fetal entre o 43º e o 61º dia após a inseminação artificial (n=5).

Grupo	Ovário	Folículo (cm)	Corpo Lúteo (cm)
G1	Esquerdo	1,1	2,1
G1	Esquerdo	1,2	2,2
G1	Direito	1,2	2,1
G2	Esquerdo	1,2	2,2
G3	Direito	0,9	2,0

No presente estudo, ao se relacionar a perda fetal com o protocolo utilizado, não se verificou benefício do uso do hCG ou do LH em relação ao GnRH (P= 0,712).

## CONCLUSÕES

A segunda aplicação de GnRH do protocolo Ovsynch tradicional pode ser substituída pelo uso de hCG ou de LH para indução da ovulação em fêmeas bubalinas obtendo-se taxas de prenhez satisfatórias.

À medida que o escore de condição corporal aumenta em uma unidade, a taxa de prenhez pode aumentar significativamente.

## REFERÊNCIAS

1. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Arquivo de notícias [Internet]. Brasília; 2009 [acesso em 2009 Mar 17]. Disponível em: <http://www.fao.org.br>
2. Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. Info Produtor [Internet]. São Paulo; 2009 [acesso em 2009 Mar 20]. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br>
3. Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverick HA, Anderson LL. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci.* 1997;80:295-300.

4. Paul V, Prakash BS. Efficacy of the ovsynch protocol for synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in Murrah buffaloes (*bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 2005;64:1049-60.
5. Fricke PM, Guenther JN, Wiltbank MC. Efficacy of decreasing the dose of gnrh used in a protocol for synchronization of ovulation and timed ai in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 1998;50:1275-84.
6. Tenhagen BA, Drillich M, Surholt R, Heuwieser W. Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: reproductive and economic considerations. *J Dairy Sci*. 2004;87:85-94.
7. Sarkar M, Prakash BS. Synchronization of ovulation in yaks (*poephagus grunniensl.*) using pgf2 and gnrh. *Theriogenology*. 2005;63:2494-503.
8. Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *J Dairy Sci*. 1989;72:68-78.
9. Campos H. Estatística não paramétrica. 4o ed. Piracicaba: ESALQ/USP; 1983.
10. Statistical Analysis System user's guide. Version 9.1. Cary - USA: SAS Institute; 2006.
11. Carvalho NAT, Reichert RH, Nichi M, Henriquez CEP, Oliveira CA, Baruselli PS. Use of hCG to timed artificial insemination in buffalo [abstracts]. In: Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction; 2004, Porto Seguro. Belo Horizonte: CBRA; 2004.v.2, p.384.
12. Baruselli PS. Sincronização da ovulação com GnRH e prostaglandina f2 $\alpha$  para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2002.
13. Neglia G, Gasparrini B, Di Palo R, De Rosa C, Zicarelli L, Campanile G. Comparison of pregnancy rates with two oestrus synchronization protocols in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology*. 2003;60:125-33.
14. Campanile G, Neglia G, Gasparrini B, Galiero G, Prandi A, Di Palo R, et al. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. *Theriogenology*. 2005;63:2334-40.
15. Baruselli OS, Madureira EH, Vsintin JA, Barnabe VH, Barnabe RC, Amaral R. Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. *Rev Bras Reprod Anim*. 1999;23:360-2.
16. Sartori R, Rosa GJ, Wiltbank MC. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci*. 2001;85:2813-22.

**Recebido em: 23/11/11**

**Aceito em: 25/07/12**

## MARCADORES INTERNOS COMO ALTERNATIVA AO ÓXIDO DE CRÔMIO-III NA DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE APARENTE EM TILÁPIA DO NILO

Renan de Mattos Botelho<sup>1</sup>  
Rafael Lopes da Silva<sup>2</sup>  
Mariucha Karina Honório Ribeiro Rocha<sup>3</sup>  
Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho<sup>3</sup>  
Flávia Mota Damasceno<sup>3</sup>  
Hinglidj de Carvalho Muller<sup>4</sup>  
Heraldo César Gonçalves<sup>5</sup>  
Luiz Edivaldo Pezzato<sup>6</sup>

### RESUMO

Foram avaliadas cinco técnicas para determinação do coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), energia bruta (EB) e matéria mineral (MM). O objetivo do estudo foi comparar marcadores internos como a fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL) e matéria orgânica resistente a hidrólise (MORH), como alternativa ao marcador externo óxido de crômio-III ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) em dietas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para tal, foram formuladas duas dietas, uma purificada com base em proteína da albumina e gelatina e outra prática, com base em proteína do farelo de soja. Óxido de crômio-III (0,1%) foi adicionado em ambas às dietas. Oitenta peixes (100,0±4,3 g) foram alojados em tanques-rede para o manejo de alimentação e coleta de fezes. O coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes foi calculado com base no teor de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  das dietas e das fezes e comparado aos demais marcadores internos pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ ). Na dieta purificada, a utilização das frações FDN, FDA, CEL e MORH como indicadores de CDA mostraram-se ineficientes em todas as variáveis analisadas. Para a dieta prática, tanto a FDA como a CEL mostraram-se semelhantes ao  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  para a determinação do CDA da MS, PB, EB e MM.

**Palavras-chave:** marcadores internos, nutrição de peixes, *Oreochromis niloticus*

### INTERNAL MARKERS AS ALTERNATIVE TO CHROMIUM-III OXIDE TO DETERMINE APPARENT DIGESTIBILITY IN NILE TILAPIA

#### ABSTRACT

It were evaluated five different technical procedures to determine apparent digestibility coefficient (ADC) of dry matter (DM), crude protein (CP), gross energy (GE) and ash. The aim of this study was to compare internal markers such as neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), cellulose (CEL) and hydrolysis resistant organic matter (HROM), as an alternative the external marker chromium oxide-III ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Thus, it were formulated two different diets, a purified diet based in protein of albumin and gelatin and a practical diet with soybean meal as protein source.

<sup>1</sup> Mestrando do Programa de Pós-graduação em Zootecnia; Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal (DMNA), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP). Fazenda Experimental Lageado, Botucatu-SP, CEP 18618-970. Fone (14) 3811-7237. naner\_mattos@hotmail.com (autor para correspondência).

<sup>2</sup> Aluno do Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, CAUNESP, UNESP, Jaboticabal-SP.

<sup>3</sup> Aluno(a) do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, FMVZ, UNESP, Botucatu-SP.

<sup>4</sup> Aluna do Curso de Zootecnia, FMVZ, UNESP, Botucatu-SP.

<sup>5</sup> Prof. Assistente Doutor, Departamento de Produção Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu-SP.

<sup>6</sup> Prof. Adjunto, Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu-SP.

Chromium oxide-III (0.1%) was added in both diets. Eighty fish (100.0±4.3 g) were placed in net tanks to feed handling and feces collecting. The ADC of nutrients was calculate based in the level of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> content in diets and feces, and compared to other internal markers using the Tukey test (P<0.05). The utilization of NDF, ADF, CEL and HROM fraction as indicators of ADC were inefficient in every analyzed variable in purified diet. However, in control diet the fractions ADF and CEL were similar to Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> to determine ADC of DM, CP, CE and Ash.

**Keywords:** internal markers, fish nutrition, *Oreochromis niloticus*

## MARCADORES INTERNOS COMO ALTERNATIVA AL ÓXIDO DE CROMO-III EN LA DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD APARENTE EN TILAPIA DEL NILO

### RESUMEN

Se evaluaron cinco técnicas para la determinación de los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de materia seca, proteína cruda (PC), energía bruta (EB) y materia mineral (MM). El objetivo del estudio fue comparar los marcadores internos como la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), celulosa (CEL) y la materia orgánica resistente a la hidrólisis (MORH) como alternativa al marcador óxido de cromo-III (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) en dietas para tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Con este fin, dos dietas fueron formuladas, una de ellas purificada con base en proteína de albumina y gelatina, y otra práctica basada en proteína de harina de soya. Fue agregado óxido de cromo-III (0,1%) a ambas dietas. Ochenta peces (100,0±4,3 g) fueron alojados en tanques-red para la gestión de las dietas y colecta de las heces. La digestibilidad aparente de nutrientes se calculó con base en el contenido de Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de las dietas y las heces, así como en la comparación con otros marcadores internos por medio de la prueba de Tukey (P<0,05). En la dieta purificada, el uso de las fracciones FDN, FDA, CEL e MORH como indicadores de la CDA demostró ser ineficaz en todas las variables. Para la dieta práctica, tanto la FDA como CEL fueron similares a Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para la determinación de la CDA de MS, PC, EB y MM.

**Palabras clave:** marcadores internos, nutrición de peces, *Oreochromis niloticus*

### INTRODUÇÃO

Devido à alimentação ser o item mais oneroso na produção animal, pesquisas em diferentes áreas visam otimizar o aproveitamento da dieta pelo animal. Dentre estas, encontram-se os ensaios de digestibilidade, objetivando conhecer o valor nutritivo dos alimentos, para que a indústria possa formular rações mais adequadas aos peixes tropicais quanto aos aspectos zootécnicos, econômicos e ambientais.

A análise química e os testes alimentares são os primeiros itens para se determinar o valor nutritivo de um ingrediente. Entretanto, após a ingestão, sua efetiva assimilação depende do uso que o organismo animal esteja capacitado a executar (1). Segundo Higuera (2), o resultado desse processo varia em função da espécie, condições ambientais, quantidade e qualidade do nutriente, proporção relativa entre os nutrientes e, do processamento a que o alimento tenha sido submetido.

Assim, a digestibilidade descreve a fração do nutriente ou da energia do alimento que não é excretada nas fezes (3). A variação do aproveitamento de nutrientes dentre as espécies pode ser quantificada pela determinação do coeficiente de digestibilidade, o qual define a habilidade com que o animal digere e absorve os nutrientes e a energia contidos na dieta (4). Segundo Sullivan e Reigh (5), independentemente do método utilizado para determinação dos

coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) de uma dieta ou alimento, os resultados dependem do meio, hábito alimentar e homeostase dos peixes, composição e processamento da dieta e, da acurácia do avaliador.

Os marcadores externos utilizados para determinar os CDA dos alimentos são adicionados à dieta ou administrados por outra via ao animal, enquanto os marcadores internos ocorrem naturalmente nos alimentos (6). Os indicadores permitem estimar a quantidade de alimento ou nutriente consumido, medir o tempo e a taxa de passagem da ingesta pelo trato digestório e estimar o coeficiente de digestibilidade total ou parcial dos alimentos.

Determinar os CDAs das rações produzidas pela indústria utilizando marcadores do próprio alimento é alternativa interessante, uma vez que é impraticável produzir tais dietas contendo os marcadores externos convencionais. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os marcadores internos do alimento como alternativa ao marcador externo óxido de cromo-III, na determinação do coeficiente de digestibilidade aparente da dieta pela tilápia do Nilo.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida na Univ. Estadual Paulista (UNESP), no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (*AquaNutri*), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu-SP, durante o período de 10 de janeiro a 10 de março de 2011.

Para determinação dos CDA, duas dietas foram formuladas de forma a atender as exigências nutricionais da tilápia do Nilo (3). Dessas, uma é denominada purificada, segundo o Instituto de Nutrição Americano (7), e foi formulada com base em proteína da albumina e gelatina (Tabela 1) e outra, denominada prática, formulada com base em proteína do farelo de soja (Tabela 2). Óxido de cromo-III foi incorporado como marcador externo na concentração de 0,1% em ambas as dietas. A composição química-bromatológica das dietas purificada e prática encontram-se na Tabela 3.

Para a confecção das rações, os ingredientes foram moídos de forma a se apresentarem com diâmetro inferior a 0,42 mm. As rações foram manualmente homogeneizadas e água a 55,0°C foi adicionada (25% do peso natural) à mistura em misturador automático. As misturas foram então peletizadas e, após resfriamento, secas em estufa com recirculação forçada de ar a 55,0°C/24 horas. Após, os péletes foram desintegrados em equipamento próprio para fracionamento, para a obtenção de grânulos homogêneos com diâmetro médio de 4,0 mm. Por fim, as dietas foram armazenadas em freezer a -20,0°C até posterior utilização.

Para alimentação, os peixes foram alojados em oito aquários circulares com capacidade de 250 litros. Para a coleta de fezes foram utilizados quatro aquários com capacidade de 300 litros, com fundo cônico para favorecer a decantação das fezes, que se depositavam em um recipiente com capacidade para 300 ml. Os aquários utilizados para alimentação eram ligados a sistema de recirculação contínua de água, com filtro físico e biológico, com aeração constante e temperatura da água mantida por meio de termostato eletrônico digital. Os aquários utilizados para a coleta de fezes eram providos de sistema individual de recirculação de água e, para o aquecimento e aeração da água, foram utilizados aquecedores individuais e pedra porosa acopladas a soprador externo.

Tabela 1. Composição percentual da dieta purificada.

Ingredientes	(%)
Albumina	32,00
Gelatina	7,70
Amido	43,83
Óleo de soja	6,00
CMC <sup>1</sup>	6,00
Fosfato bicálcico	3,00
Suplemento mineral e vitamínico <sup>2</sup>	0,80
Vitamina C <sup>3</sup>	0,05
BHT <sup>4</sup>	0,02
Sal comum	0,50
Óxido de crômio-III <sup>5</sup>	0,10
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

<sup>1</sup>CMC, Carboximetilcelulose; <sup>2</sup>Suplemento vitamínico e mineral. Composição por quilo de produto: Vit. A, 1.200.000 UI; vit. D3, 200.000 UI; vit. E, 12.000mg; vit. B1, 4.800 mg; vit. B2, 4.800 mg; vit. B6, 4.000 mg; vit. B12, 4.800 mg; ác. fólico, 1.200 mg; pantotenato de cálcio, 12.000 mg; vit. C, 48.000 mg; biotina, 48 mg; colina, 65.000 mg; ác. nicotínico, 24.000 mg; Fe, 10.000 mg; Cu, 600 mg; Mn, 4.000 mg; Zn, 6.000 mg; I, 20 mg; Co, 2 mg e Se, 20 mg; <sup>3</sup>Vitamina C: sal cálcica 2-monofosfato de ácido ascórbico, 42% de princípio ativo; <sup>4</sup>Butil-Hidróxi-tolueno (Antioxidante); <sup>5</sup>Marcador externo.

Tabela 2. Composição percentual da dieta prática.

Ingredientes	(%)
Farelo de soja	60,34
Milho	33,63
Óleo de soja	2,44
DL-Metionina	0,20
Treonina	0,21
Fosfato bicálcico	2,11
Sal comum	0,10
Suplemento Vit. e mineral <sup>1</sup>	0,80
Vitamina C <sup>2</sup>	0,05
BHT <sup>3</sup>	0,02
Óxido de crômio-III <sup>4</sup>	0,10
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico e mineral, Composição por quilo de produto: Vit. A, 1.200.000 UI; vit. D3, 200.000 UI; vit. E, 12.000mg; vit. B1, 4.800 mg; vit. B2, 4.800 mg; vit. B6, 4.000 mg; vit. B12, 4.800 mg; ác. fólico, 1.200 mg; pantotenato de cálcio, 12.000 mg; vit. C, 48.000 mg; biotina, 48 mg; colina, 65.000 mg; ác. nicotínico, 24.000 mg; Fe, 10.000 mg; Cu, 600 mg; Mn, 4.000 mg; Zn, 6.000 mg; I, 20 mg; Co, 2 mg e Se, 20 mg; <sup>2</sup>Vitamina C: sal cálcica 2-monofosfato de ácido ascórbico, 42% de princípio ativo; <sup>3</sup>Butil-Hidróxi-tolueno (Antioxidante); <sup>4</sup>Marcador externo.

Tabela 3. Composição química-bromatológica das dietas (% da matéria natural)

Nutriente <sup>1</sup>	Dieta purificada	Dieta prática
MS	88,83	93,70
EB (kcal/kg)	4184	4216
PB	33,67	29,13
MM	5,20	6,94
FB	4,35	4,75
EE	6,70	4,48

<sup>1</sup>MS, matéria seca; EB, energia bruta; PB, proteína bruta; MM, matéria mineral; FB, fibra bruta; EE = extrato etéreo.

Os peixes, oitenta juvenis (100,0±4,3 g), foram alojados na densidade de dez peixes por unidade, em tanques-rede de formato circular (80,0 cm de diâmetro e 60,0 cm de comprimento), confeccionados em tela plástica (malha de 1,5 cm). Esses tanques-rede foram utilizados para abrigar os peixes e facilitar o manejo entre os sistemas de alimentação e coleta de fezes, proporcionando menor estresse aos peixes. Empregou-se a metodologia proposta por Pezzato et al. (8), onde os peixes foram alimentados em um sistema independente do sistema coletor de fezes, evitando a contaminação do material colhido.

Durante o período matutino, os peixes foram alimentados a cada duas horas e no período vespertino a alimentação foi intensificada a cada hora. Esta frequência alimentar foi aplicada a um dos grupos (quatro das gaiolas) em dias subsequentes, do qual eram obtidas as amostras de fezes. Ao segundo grupo, era adotado apenas o manejo de alimentação. Às 18 horas, os tanques-rede eram transferidos aos aquários de coleta de fezes, onde permaneceram até a manhã do dia seguinte, sendo, então, o tanque-rede devolvido ao respectivo aquário de alimentação e a coleta das fezes realizada. Após a coleta, as fezes de cada aquário de coleta foram centrifugadas (600 rpm/min), descartando assim a fase líquida, desidratadas em estufa com recirculação forçada (55,0°C/48 horas), moídas, homogeneizadas e armazenadas a -20,0°C. Foi coletado um volume representativo de fezes para obtenção de quatro repetições por tratamento.

As análises químico-bromatológicas das rações e fezes foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da FMVZ – UNESP – Botucatu, segundo os protocolos da AOAC (9).

Foram comparados os CDA da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), energia bruta (EB) e matéria mineral (MM), empregando-se os seguintes marcadores: fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL), matéria orgânica resistente a hidrólise (MORH) e o marcador externo óxido de crômio-III (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

As análises para determinação dos valores de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido foram realizadas segundo Van Soest e Wine (10), seguindo modificações propostas por Souza et al. (11), Silva e Queiroz (12) e Kelley (13). A determinação da celulose foi realizada segundo Cochran et al. (14) e a da MORH de acordo com o Compêndio (15). As análises para determinação da concentração de crômio-III foram realizadas segundo Bremer Neto et al. (16).

O coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) foi calculado de acordo com a seguinte equação (17).

$$CDA_n = 100 - 100 \left[ \left( \frac{\% \text{marcador}_d}{\% \text{marcador}_f} \right) \times \left( \frac{\% N_f}{\% N_d} \right) \right]$$

Onde:

CDA<sub>n</sub> = coeficiente de digestibilidade aparente; %marcador<sub>d</sub> = percentagem de marcador na dieta; %marcador<sub>f</sub> = percentagem de marcador nas fezes; %N<sub>f</sub> = percentagem de nutriente nas fezes; %N<sub>d</sub> = percentagem de nutriente na dieta.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 x 5), com duas rações e cinco marcadores. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando constatada significância, foi aplicado o teste de Tukey (18). Os dados analisados foram submetidos ao programa computacional SAEG (19).

Os parâmetros de oxigênio dissolvido (5,7±0,83 mg/L) e pH (7,0±0,5) foram determinados semanalmente durante o período experimental utilizando-se sonda YSI 556 MPS<sup>®</sup>. A temperatura da água (26,0±1,32°C) foi aferida diariamente por meio de termostato digital. A iluminação ambiente foi obtida por meio de lâmpadas fluorescentes, com fotoperíodo estabelecido das 8 às 18 horas.

## RESULTADOS

Observou-se efeito significativo ( $P < 0,05$ ), apresentando interação entre os marcadores e rações, para todas as variáveis em estudo (Tabela 4). O desdobramento da interação entre marcador e ração encontra-se na Tabela 5. Não foi verificada diferença estatística entre os CDA das rações ( $P > 0,05$ ) para a variável PB utilizando a fração MORH e para as variáveis MS, EB e MM, utilizando  $Cr_2O_3$  como marcador.

Tabela 4. Valores de coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), energia bruta (EB) e matéria mineral (MM) expressos na matéria seca, determinados em juvenis de tilápia do Nilo submetidos à alimentação com dieta purificada e prática utilizando-se diferentes marcadores.

Marcador	MS	PB	EB	MM
FDN <sup>1</sup>	-26,82	68,27	-15,54	-106,48
FDA <sup>2</sup>	10,67	77,19	17,49	-46,64
CEL <sup>3</sup>	51,89	87,58	56,18	19,71
MORH <sup>4</sup>	31,22	82,10	36,42	-18,49
$Cr_2O_3$ <sup>5</sup>	73,85	94,16	78,52	51,83
<b>Dieta</b>				
Purificada	-5,56	73,83	1,19	-68,08
Prática	61,88	89,89	68,04	28,04
CV <sup>6</sup> (%)	2,49	1,39	2,53	2,71
<b>Valor de P</b>				
Marcador (M)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Dieta (D)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
M x D	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

<sup>1</sup>FDN, Fibra em detergente neutro; <sup>2</sup>FDA, Fibra em detergente ácido; <sup>3</sup>CEL, Celulose; <sup>4</sup> MORH, Matéria orgânica resistente a hidrólise; <sup>5</sup>Óxido de crômio-III; <sup>6</sup>CV, Coeficiente de variação.

Tabela 5. Desdobramento da interação entre dieta e marcadores para os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), energia bruta (EB) e matéria mineral (MM) para juvenis de tilápia do Nilo.

<b>MS</b>					
Dieta	FDN	FDA	CEL	MORH	$Cr_2O_3$
Purificada	112,59Db	47,45Cb	29,89Bb	28,09Bb	74,24Aa
Prática	58,95Ba	68,78Aa	73,88Aa	34,34Ca	73,46Aa
<b>PB</b>					
Dieta	FDN	FDA	CEL	MORH	$Cr_2O_3$
Purificada	47,41Db	62,32Cb	82,09Bb	81,97Ba	95,36Aa
Prática	89,14Ba	92,06Aa	93,06Aa	82,31Ca	92,96Ab
<b>EB</b>					
Dieta	FDN	FDA	CEL	MORH	$Cr_2O_3$
Purificada	97,55Db	39,77Cb	34,01Bb	29,11Bb	80,15Aa
Prática	66,46Ba	74,76Aa	78,35Aa	43,73Ca	76,91Aa
<b>MM</b>					
Dieta	FDN	FDA	CEL	MORH	$Cr_2O_3$
Purificada	235,47Cb	134,94Db	10,96Bb	12,93Bb	53,91Aa
Prática	22,49Ba	41,65Aa	50,36Aa	24,04Ca	49,75Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e letra minúscula na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

## DISCUSSÃO

A utilização das frações FDN, FDA, CEL e MORH como marcadores indicativos de CDA mostraram-se ineficientes para a dieta purificada em todas as variáveis analisadas quando comparados à técnica que utiliza o  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  como marcador do CDA. Pode-se atribuir esse resultado ao fato da utilização na dieta purificada do CMC (carboximetilcelulose) em sua composição. Esse componente apresenta, dentre suas características, ser forte ligante, espessante e estabilizante, além de ser doador de viscosidade para algumas formulações de detergentes. Forma filmes resistentes a óleos, graxas, solventes orgânicos e serve de meio de suporte para imobilização de enzimas e/ou micro-organismos (20-22). Esta última característica talvez seja o principal fator a interferir no processo de análise química, uma vez que durante as análises entram em contato com a enzima  $\alpha$ -amilase, para que o amido seja degradado e não interfira nas reações *in vitro*, realizadas de forma seqüencial (12-14).

Para a dieta prática, o uso da fração FDN como marcador interno resultou em valores de CDA diferentes ( $P < 0,05$ ) aos obtidos com a utilização do  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , corroborando os dados de De Silva (23) que, em ensaio de digestibilidade com a tilápia do Nilo, utilizando a fibra bruta como marcador interno, encontrou resultados baixos e inconsistentes dos CDA. O autor ainda sugeriu que a fibra bruta, devido à morfologia do sistema digestivo das tilápias, pode ter sofrido degradação microbiana no intestino posterior, interferindo na recuperação deste marcador. Entretanto, resultado contrário foi descrito por Sampaio et al. (24) que, em estudo com esta mesma espécie, reportaram valores de CDA semelhantes ao  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  para a matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo.

Para a dieta prática, a utilização da FDA como marcador interno na ração prática resultou em valores de CDA semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos obtidos com o uso do  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . Resultado semelhante foi descrito por Morales et al. (25), que em experimento de digestibilidade com a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, relataram resultados de CDA da matéria seca e proteína similares, quando do emprego dos marcadores óxido de cromo ou fibra bruta. Entretanto, resultado diferente foi encontrado por Vidal Jr et al. (26) que, em ensaio de digestibilidade com tambaqui *Colossoma macropomum*, observaram valores do coeficiente de digestibilidade verdadeiro para a matéria seca e proteína menores ( $P < 0,05$ ) que os obtidos com o uso do marcador externo  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . Os autores ainda sugeriram que essa diferença seja devida a baixa recuperação deste marcador, fato não observado neste estudo.

A utilização da fração CEL resultou em valores de CDA para MS, PB, EB e MM semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos obtidos com o uso da FDA e do  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  como marcadores para a dieta prática. Resultado diferente foi descrito por Sampaio et al. (24) que afirmaram que as frações MORH e lignina, além da FDN, são as mais indicadas para a determinação de CDA da proteína e do extrato etéreo, porém não para a matéria seca, quando do emprego de dieta contendo ingredientes de origem exclusivamente vegetal.

Buddington (27) em estudo comparativo entre marcadores indicativos de CDA, em truta arco-íris e três espécies de tilápia (*Oreochromis aureus*, *O. mossambica* e *O. nilotica*), concluiu que a MORH é mais eficiente e acurada que o  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . Neste estudo, a fração MORH, devido a sua baixa recuperação, não apresentou eficiência como marcador indicativo de digestibilidade, corroborando os dados de De Silva e Perera (28), em estudo com o ciclídeo asiático *Etroplus suratensis*.

## CONCLUSÃO

As frações FDA e CEL podem ser utilizadas como alternativa ao marcador externo  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  em rações práticas para a tilápia do Nilo. Entretanto, as frações FDN, FDA, CEL e MORH não se mostraram eficientes quando empregadas como marcadores internos em dieta purificada.

## COMITE DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos realizados encontram-se de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação animal, estabelecidos pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ/UNESP/Botucatu, sendo o experimento aprovado pela mesma (Protocolo nº 167/2011-CEUA) em 03 de junho de 2011.

## REFERÊNCIAS

1. Maynard LA, Loosly JK. Nutrição animal. Rio de Janeiro: McGraw Hill; 1966.
2. Higuera M. Diseños y métodos experimentales de evaluación de dietas. In: Espinosa J, Labarta U. Nutricion en acuicultura II. Madrid: Industrias Gráficas España; 1987. p.291-316.
3. National Research Council. Nutrient requirements of warmwater, fishes and shellfishes: nutrient requirements of domestics animals. Washington DC: National Academic Press; 1993.
4. Andrigueto JM, Perly L, Minardi I, Gemael A, Fleming JS, Souza GA, et al. Nutrição animal. Paraná: Nobel; 1982.
5. Sullivan JA, Reigh RC. Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morene saxatilis* x *Morene chrysops*). *Aquaculture*. 1995;138:313-22.
6. Kotb AR, Luckey TD. Markers in nutrition. *Nutr Abstr Rev*. 1972;42:814-45.
7. American Institute of Nutrition. Report of the american institute of nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr*. 1977;107:1340-8.
8. Pezzato LE, Miranda EC, Barros MM, Furuya WM, Pinto LGQ. Digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína bruta e a energia digestível de alguns alimentos alternativos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Sci*. 2004;26:329-38.
9. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analisis. Arlington: Association of Analytical Communities; 1995.
10. Van Soest PJ, Wine RH. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. Determination of plant-cell constituents. *J Assoc Off Anal Chem*. 1967;50:50-5.
11. Souza GB, Nogueira ARA, Sumi LM, Batista LAR. Método alternativo para a determinação de fibra em detergente neutro e detergente acido. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 1999.
12. Silva DJ, Queiroz AC. Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos. 3ª ed. Viçosa - MG: Imprensa Universitária; 2002.
13. Kelley CL. Operator's manual. New York: Ankom Technology; 1998.
14. Cochran RC, Adams DC, Wallace JD, Galyean ML. Predicting digestibility of different diets with internal makers: evaluation of four potential markers. *J Anim Sci*. 1986;63:1476-83.

15. Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. Guia de métodos analíticos, métodos físicos-químicos. São Paulo: Sindirações/MAPA; 2005.
16. Bremer Neto H, Graner CAF, Pezzato LE, Padovani LR. Determinação de rotina do cromo em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5 difenilcarbazida. Cienc Rural. 2005;35:691-7.
17. Nose T. On the digestion of food protein by gold-fish (*Carassius auratus*) L. and rainbow trout (*Salmo irideus*). Bull Freshw Fish Res Lab. 1960;10:11-22.
18. Steel RGD, Torrie SH. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 2nd ed. Auckland: McGraw-Hill International; 1984.
19. Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas - manual do usuário. versão 9.1. Viçosa - MG: UFV; 2007.
20. Fujimoto J, Reis EAO, Petri DFS. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. Quim Nova. 2002;25:757-61.
21. Will R, Sasano T. Chemical economics handbook - marketing research report abstracts cellulose ethers. USA: CEH; 2001.
22. Sieger CNH, Kroon AGM, Batelaan JG, van Ginkel CG. Biodegradation of caboxymethyl celluloses by agrobacterium CM-1. Carbohydr Polym. 1995;27:137-43.
23. De Silva SS. Evaluation of the use of internal and external markers in digestibility studies. In: Cho CY. Finfish nutrition in Asia, methodological approaches to research and development. Ottawa: International Development Research Center; 1985. p.96-102.
24. Sampaio FG, Pezzato LE, Barros MM, Kleemann GK, Falcon DR, Hisano H, et al. Internal and external dietary markers to determine the apparent digestibility coefficient for Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Book of abstracts. Salvador. World Aquaculture; 2003. p.673.
25. Morales AE, Cardenete G, Sanz A, Higuera M. Re-evaluation of crude fibre and acid-insoluble ash as inert markers, alternative to chromic oxide, in digestibility studies with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 1999;179:71-9.
26. Vidal Jr MV, Donzele JL, Andrade DR, Santos LC. Determinação da digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta do fubá de milho e do farelo de soja para tambaqui (*Colossoma macropomum*), utilizando-se técnicas com uso de indicadores internos e externos. Rev Bras Zootec. 2004;33:2193-200.
27. Buddington RK. Hydrolysis-resistant organic matter as a reference for measurement of fish digestive efficiency. Trans Am Fish Soc. 1980;109:653-6.
28. De Silva SS, Perera MK. Digestibility of an aquatic macrophyte by the cichlid *Etilapia suratensis* (bloch) with observations on the relative merits of three indigenous components as markers and daily changes in protein digestibility. J Fish Biol. 1983;23:675-84.

**Recebido em: 31/01/12**

**Aceito em: 20/08/12**

## INFLUENCE OF LINEAGE OF OOCYTE DONOR ON THE YIELD AND MORPHOLOGY OF OOCYTES RECOVERED BY ULTRASOUND-GUIDED FOLLICULAR ASPIRATION IN NELLORE COWS

Renata Sanches Calegari<sup>1</sup>  
Diego Gouvêa de Souza<sup>2</sup>  
Daniela Martins Paschoal<sup>3</sup>  
Mateus José Sudano<sup>4</sup>  
Alicio Martins Júnior<sup>5</sup>

### ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the influence of lineage of oocyte donors on the number and quality of oocytes obtained through ultrasound-guided follicular aspiration in Nellore breed cows derived from two lineages of bulls (Karvadi; K and Taj-Mahal; T). Both maternal (Km and Tm) and paternal (Kp and Tp) lineages, as well as their combinations were investigated. Oocyte aspirations were repeatedly performed with an aspiration interval of 15 days in 56 donor females. Recovered cumulus oocyte-complexes (COCs) were counted, morphologically examined and classified into seven categories (grades from I to VII) according to the number of layers of the cumulus oocyte and cytoplasm appearance. The mean number of oocytes retrieved from donors of lineage Tp-Tm was significantly higher ( $28.23 \pm 1.92$ ,  $P < 0.05$ ) than those obtained from lineages Kp-Tm, Kp-Km, and Tp-Km ( $21.34 \pm 1.32$ ,  $21.28 \pm 1.73$ , and  $16.72 \pm 1.31$ , respectively). There was no significant difference in the mean number of recovered oocytes between donors of lineages Kp-Km and Kp-Tm, whereas animals of lineage Tp-Km yielded the lowest number of oocytes. Higher mean number of grade III oocytes was recovered from donors of lineage Kp than lineage Tp ( $10.11 \pm 0.66$  versus  $8.79 \pm 0.58$ , respectively), with more grade III oocytes being obtained in both lineages as compared to the others. Paternal lineage did not influence the quality of recovered oocytes in any other category, but both Kp and Tp yielded a great mean number of oocytes graded as I, II, and III ( $3.14 \pm 0.21$ ;  $4.93 \pm 0.33$ , and  $10.11 \pm 0.66$  versus  $3.19 \pm 0.21$ ,  $5.59 \pm 0.44$ , and  $8.79 \pm 0.58$ , respectively) than those classified as IV, V, VI, and VII. However, when considering the data from the maternal lineage significantly more oocytes ( $P < 0.05$ ) of grade I, II and III were obtained from Taj-Mahal ( $11.67 \pm 0.67$ ,  $5.9 \pm 0.42$  and  $3.64 \pm 0.25$ , respectively) than for lineage Karvadi, with similar results for oocytes of grades IV, V, VI, and VII. Similarly to the paternal lineage, the number of oocytes of grade III was superior ( $P < 0.05$ ) when compared to other categories for both lineages. In conclusion, we demonstrate here a direct influence of lineage of oocyte donor on the production and quality of oocytes obtained through ultrasound-guided follicular aspiration in Nellore cows.

**Keywords:** oocyte, quality, lineage, follicular aspiration, Nellore

<sup>1</sup> Mestranda da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ-USP, São Paulo-SP, 05508-270, Brasil. E-mail: renatascalegari@hotmail.com

<sup>2</sup> Estagiário da Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA – UNESP, Araçatuba-SP, 16050-680, Brasil. E-mail: diego.souza@uol.com.br

<sup>3</sup> Estagiária da Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA – UNESP, Araçatuba-SP, 16050-680, Brasil. E-mail: dmpaschaol@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Graduando do Curso de Medicina Veterinária, FMVZ-UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil. E-mail: mjsudano@gmail.com

<sup>5</sup> Professor Adjunto do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, FMVA-UNESP, Araçatuba-SP, 16050-680, Brasil. E-mail: [amartins@fmva.unesp.br](mailto:amartins@fmva.unesp.br). Correspondência.

## INFLUÊNCIA DA LINHAGEM DA DOADORA DE OÓCITO SOBRE A PRODUÇÃO E MORFOLOGIA DE OÓCITOS OBTIDOS PELA ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSOM EM VACAS NELORE

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a influência da linhagem da doadora de oócito sobre o número e qualidade morfológica de oócitos obtidos através de aspiração folicular guiada por ultrassom em animais da raça Nelore, descendentes de duas linhagens de touros (Karvadi; K e Taj-Mahal; T). As linhagens maternas (Km e Tm) e paternas (Kp e Tp), e suas combinações, foram avaliadas. As aspirações de oócitos foram repetidamente realizadas em um intervalo de 15 dias em 56 doadoras. Os oócitos obtidos foram contados, analisados morfológicamente e classificados em sete categorias (graus I a VII), de acordo com o número de células do cumulus e aparência do citoplasma. O número médio de oócitos recuperados das doadoras da linhagem Tp-Tm foi significativamente maior ( $28,23 \pm 1,92$ ,  $P < 0,05$ ) do que os das linhagens Kp-Tm, Kp-Km, and Tp-Km ( $21,34 \pm 1,32$ ;  $21,28 \pm 1,73$  e  $16,72 \pm 1,31$ , respectivamente). Não houve diferença significativa no número médio de oócitos colhidos entre as doadoras das linhagens Kp-Km e Kp-Tm, enquanto que animais da linhagem Tp-Km produziram o mais baixo número de oócitos. Um maior número ( $P < 0,05$ ) de oócitos de grau III foi recuperado das doadoras da linhagem Kp do que da linhagem Tp ( $10,11 \pm 0,66$  versus  $8,79 \pm 0,58$ , respectivamente), com uma maior quantidade de oócitos de grau III sendo obtida em ambas as linhagens quando comparado com as demais. A linhagem paterna não influenciou na qualidade dos oócitos aspirados em nenhuma das categorias, mas ambas as linhagens Kp e Tp produziram um maior número de oócitos de graus I, II e III ( $3,14 \pm 0,21$ ;  $4,93 \pm 0,33$  e  $10,11 \pm 0,66$  versus  $3,19 \pm 0,21$ ;  $5,59 \pm 0,44$  e  $8,79 \pm 0,58$ , respectivamente) do que aqueles classificados como de graus IV, V, VI e VII. Entretanto, quando os dados da linhagem materna foram considerados, mais oócitos ( $P < 0,05$ ) de graus I, II e III foram obtidos da linhagem Taj-Mahal ( $11,67 \pm 0,67$ ;  $5,9 \pm 0,42$  e  $3,64 \pm 0,25$ , respectivamente) do que para a linhagem Karvadi, com resultados similares para os oócitos de graus IV, V, VI e VII. Da mesma forma que a linhagem paterna, o número de oócitos de grau III foi superior ( $P < 0,05$ ) quando comparado com as categorias, nas duas linhagens. Concluindo, demonstramos a influência direta da linhagem da doadora de oócito sobre o número e qualidade dos oócitos obtidos pela aspiração folicular guiada por ultrassom em vacas da raça Nelore.

**Palavras-chave:** oócito, qualidade, linhagem, aspiração folicular, Nelore

## INFLUENCIA DEL LINAJE DE LA DONADORA DE OVOCITO SOBRE LA PRODUCCIÓN Y MORFOLOGÍA DE LOS OVOCITOS OBTENIDOS A TRAVÉS DE ASPIRACIÓN FOLICULAR GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA EN VACAS NELORE

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue investigar la influencia del linaje de las donadoras de ovocitos en el número y la calidad de los ovocitos obtenidos por aspiración folicular guiada por ecografía en animales de la raza Nelore, descendientes de dos linajes de toros (Karvadi, K y Taj-Mahal, T). Fueron evaluados los linajes maternos (Km y Tm) paternos (Kp y Tp) y sus combinaciones. Fueron realizadas varias aspiraciones de ovocitos en un intervalo de 15 días en 56 donadoras. Los ovocitos fueron contados, analizados morfológicamente y clasificados en siete categorías (grados I a VII) en función del número de células del cumulus y el aspecto del citoplasma. El número medio de ovocitos recuperados de donadoras del linaje Tp-Tm fue

significativamente mayor ( $28,23 \pm 1,92$ ,  $P < 0,05$ ) que los de los linajes Kp-Tm, Kp-Km y Tp-Km ( $21,34 \pm 1,32$ ,  $21,28 \pm 1,73$  y  $16,72 \pm 1,31$ ), respectivamente. No hubo diferencia significativa en el número medio de ovocitos recolectados de las donadoras Kp-Km y Kp-Tm, mientras que los animales Tp-Km produjeron la menor cantidad de ovocitos. Fueron recuperados más ovocitos ( $P < 0,05$ ) de grado III del linaje donador Kp que del linaje Tp ( $10,11 \pm 0,66$  contra  $8,79 \pm 0,58$ , respectivamente), con mayor número de ovocitos grado III obtenidos en esos dos linajes en comparación con los demás. El linaje paterno no afectó la calidad de los ovocitos en ninguna de las categorías, pero ambos linajes Kp y Tp produjeron un gran número de ovocitos de grados I, II y III ( $3,14 \pm 0,21$ ,  $4,93 \pm 0,33$  y  $10,11 \pm 0,66$  contra  $3,19 \pm 0,21$ ,  $5,59 \pm 0,44$  y  $8,79 \pm 0,58$ , respectivamente) de los clasificados como grado IV, V, VI y VII. Sin embargo, cuando fueron considerados los datos del linaje materno, se obtuvieron más ovocitos ( $P < 0,05$ ) para los grados I, II y III a partir del linaje de Taj-Mahal ( $11,67 \pm 0,67$ ,  $5,9 \pm 0,42$  y  $3,64 \pm 0,25$ , respectivamente) que del linaje Karvadi, con resultados similares a los ovocitos de los grados IV, V, VI y VII. Del mismo modo que el linaje paterno, el número de ovocitos de grado III fue mayor ( $P < 0,05$ ) en comparación con las categorías para ambos linajes. En conclusión, se demostró la influencia directa del linaje de las donadoras de ovocitos en el número y la calidad de los ovocitos obtenidos por aspiración folicular guiada por ecografía en vaquillas Nelore.

**Palabras clave:** ovocitos, calidad, linaje, aspiración folicular, Nelore

## INTRODUCTION

The combination of ovum pick-up (OPU) and in vitro embryo production (IVP) techniques emerged as potential alternative for the classical multiple ovulation and embryo transfer (MOET), providing the multiplication of desirable genotypes in bovine populations. The first guided ultrasound follicular aspiration (OPU) was reported by Pieterse et al. (1) and provided means to explore the ovarian potential. However, successful application of OPU and IPV procedures depend initially on the number of follicles available for puncture and quality of cumulus oocyte-complexes (COCs).

There is great evidence that several factors exert considerable influence on the oocyte production (2) and quality (3) such as donor age (3, 4), nutrition (5), season (3, 6), besides others. However, very few studies with regard to the influence of breed on the quantity and/or quality of oocytes has been made (7), particularly when related to lineage of oocyte donor and identification through mitochondrial DNA assay (8).

During the last decades, advancements on molecular genetics have led to the identification of multiple genes or genetic markers associated to genes that affect the economic interest traits (9) including those associated to a single gene or genomic regions that affect quantitative trait loci (QTL). Thus, with bovine genome sequencing and genes for these traits available, OPU and IVP will provide a means to rapidly multiplying rare genes or QTL of high value (10). Despite the difficulties in mapping QTLs in ruminants, several traits had their variations attributed to some regions of the bovine genome, such as for milk production (11) and for ovulation rate (12). In ovine, the mapping through QTL enabled the identification of the Booroola gene (FecB) associated to the multiple ovulation rate (13).

In Brazil, Nelore breed is the most important beef cattle, which has been developed as result of many years of selective breeding from six major ancestor bulls imported from India in the decade of 60 (14). These animals have characterized their respective lineages, as evidenced by the well-defined genetic traits. However, no comparison has been described in the literature about the availability of COCs as well as their quality among lineages in this breed. Thus, the aim of this study was to investigate whether cows derived from two distinct

lineages of Nellore bulls (Karvadi and Taj-Mahal) could further enhance the oocyte donor's performance, in terms of providing an increase in quantity and morphological quality of oocytes recovered by ultrasound-guided follicular aspiration.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Oocyte donors

The study was carried out with animals from two farms located at the region of Araçatuba, state of São Paulo (21°12'40" S and 50°53'21" W; 20°55'47" S and 50°32'06" W), belonging to the same owner. Fifty-six pure-bred Nellore cows originated from two lineages of bulls (Karvadi, K and Taj-Mahal, T) were selected as oocyte donors and randomly assigned according to maternal (m) or paternal (p) lineages, as well as their combinations, as follows: Kp-Km (n=15), Kp-Tm (n=11), Tp-Km (n=21), and Tp-Tm (n= 9). Both farms had cows of the four combinations of lineages which, in turn, were kept under the same nutritional and health conditions throughout the experimental period (body condition score of  $3.6 \pm 0.08$  in a five point scale). At the beginning of the experiment the animals were also distributed evenly according to age within each group to avoid its effect (age were from 37 to 214 months old with mean of  $78 \pm 12$ ). Animals were subjected to OPU sessions every 15 days over a period of 2 years.

### 2. Animal and equipment preparation

Donor females were subjected to epidural anesthesia, and then subjected to follicular puncture using a 5 MHz vaginal convex transducer and an ultrasound scanner (Aloka SSD-500, Japan) equipped with a needle guide attached to a single lumen 18-gauge 55 cm long sterile needle. A vacuum pressure of 70 mmHg was applied for oocyte recovery through use of a vacuum pump.

### 3. Aspiration technique

All the visible follicles were punctured. Continuous suction was applied and the follicular liquid and oocytes were collected in 50 ml- centrifuge tube containing Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) supplemented with 1% fetal calf serum and 10 iu/ml heparin. At the end of the procedure, the tube containing the aspirated follicular fluid was taken to the laboratory for recovery of COCs.

### 4. Oocyte classification

COCs were evaluated under a stereomicroscope (Olympus, Japan) and classified into seven morphological categories, according to the characteristics of cumulus investment and cytoplasm, as follows: grade I, oocytes with multilayered compact cumulus oophorus and an homogeneous cytoplasm; grade II, compacted COCs with at least 3 layers of cells and homogeneous or heterogeneous cytoplasm; grade III, COCs partially denuded and/or with cytoplasm having few pyknotic areas; grade IV, mostly devoid of cumulus cells; grade V, showing expansion of cumulus cell and some signals of pyknosis; grade VI, atretic; and grade VII, degenerated oocytes.

### 5. Statistical analyses

For the statistical analyses, data from variable number of oocytes were transformed into  $\log(x+1)$  and subjected to analysis of variance with averages compared through the Tukey' test. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ . The values are reported as means  $\pm$  SEM in tables.

## RESULTS

Oocyte donors derived from two unrelated lineages of bulls (Karvadi and Taj-Mahal) were investigated for their influences on the number and quality of COCs recovered by ultrasound-guided follicular aspiration. For the 56 donors, a total of 9.843 COCs were collected during 470 OPU sessions. As shown in Table 1, the mean number of oocytes retrieved from donors of lineage Tp-Tm was significantly higher ( $28.23 \pm 1.92$ ,  $P < 0.05$ ) than those obtained from lineages Kp-Tm, Kp-Km, and Tp-Km ( $21.34 \pm 1.32$ ,  $21.28 \pm 1.73$ , and  $16.72 \pm 1.31$ , respectively).

Table 1. Number of follicular aspirations (n), total number of the aspirated oocytes (x) and mean ( $\pm$  SEM) of the number of oocytes obtained by aspiration in Nellore cows, according to the paternal and maternal lineages.

Paternal Lineage	Maternal Lineage					
	Karvard			Taj-Mahal		
	n	x	mean $\pm$ SEM	n	x	mean $\pm$ SEM
Karvard	97	2064	$21.28 \pm 1.73$ <sup>aA</sup>	97	2070	$21.34 \pm 1.32$ <sup>bA</sup>
Taj-Mahal	181	3027	$16.72 \pm 1.31$ <sup>bB</sup>	95	2682	$28.23 \pm 1.92$ <sup>aA</sup>

<sup>A,B</sup> - Values with different letters in the same row are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>a,b</sup> - Values with different letters in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

The morphological distribution of COCs regarding the lineages Kp and Tp is shown in Table 2. Higher number ( $P < 0.05$ ) of grade III oocytes was recovered per session from donors of lineage Kp than lineage Tp ( $10.11 \pm 0.66$  versus  $8.79 \pm 0.58$ , respectively), but the total number of oocytes graded as I, II, and III was similar between Kp and Tp ( $18.18 \pm 1.2$  versus  $17.57 \pm 1.23$ , respectively), with more grade III oocytes being obtained in both lineages as compared to the others. Paternal lineage did not influence the quality of recovered oocytes in any other category, but both Kp and Tp yielded a great mean number of oocytes graded as I, II, and III ( $3.14 \pm 0.21$ ;  $4.93 \pm 0.33$ , and  $10.11 \pm 0.66$  versus  $3.19 \pm 0.21$ ,  $5.59 \pm 0.44$ , and  $8.79 \pm 0.58$ , respectively) than those other categories.

Table 2. Number of follicular aspirations (n), total number of the aspirated oocytes (x) and mean ( $\pm$  SEM) of the number of oocytes obtained by aspiration in Nellore cows, according to the paternal lineages and morphological classification of oocytes.

Grade	Paternal Lineage					
	Karvard			Taj-Mahal		
	n	x	mean $\pm$ SEM	n	x	mean $\pm$ SEM
I	194	609	$3.14 \pm 0.21$ <sup>cA</sup>	276	881	$3.19 \pm 0.21$ <sup>cA</sup>
II	194	957	$4.93 \pm 0.33$ <sup>bA</sup>	276	1543	$5.59 \pm 0.44$ <sup>bA</sup>
III	194	1962	$10.11 \pm 0.66$ <sup>aA</sup>	276	2427	$8.79 \pm 0.58$ <sup>aB</sup>
IV	194	359	$1.85 \pm 0.15$ <sup>dA</sup>	276	481	$1.74 \pm 0.16$ <sup>dA</sup>
V	194	22	$0.11 \pm 0.04$ <sup>fA</sup>	276	21	$0.08 \pm 0.03$ <sup>fA</sup>
VI	194	135	$0.70 \pm 0.08$ <sup>eA</sup>	276	245	$0.89 \pm 0.09$ <sup>eA</sup>
VII	194	90	$0.46 \pm 0.08$ <sup>efA</sup>	276	111	$0.40 \pm 0.06$ <sup>fA</sup>
Total	194	4134	$21.30 \pm 1.55$ <sup>A</sup>	276	5709	$20.68 \pm 1.57$ <sup>A</sup>

<sup>A,B</sup> - Values with different letters in the same row are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>a,b</sup> - Values with different letters in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

However, when considering the data from the maternal lineage (Table 3) significantly more oocytes ( $P < 0.05$ ) of grade I, II and III were obtained from Taj-Mahal ( $11.67 \pm 0.67$ ,  $5.9 \pm 0.42$  and  $3.64 \pm 0.25$ , respectively) than for lineage Karvadi, as well as higher number of grades I, II, and III oocytes ( $P < 0.05$ ) were found for lineage Taj-Mahal ( $21.21 \pm 1.34$ ) than for Karvadi ( $15.50 \pm 1.15$ ) with no differences between the lineages for oocytes of grades IV, V, VI, and VII. Similarly to the paternal lineage, the number of oocytes of grade III was superior ( $P < 0.05$ ) when compared to other categories for both lineages.

Table 3. Number of follicular aspirations (n), total number of the aspirated oocytes (x) and mean ( $\pm$  SEM) of the number of oocytes obtained by aspiration in Nellore cows, according to the maternal lineages and morphological classification of oocytes.

Grade	Maternal Lineage					
	Karvard			Taj-Mahal		
	n	x	mean $\pm$ SEM	n	x	mean $\pm$ SEM
I	278	791	$2.85 \pm 0.19$ <sup>cB</sup>	192	699	$3.64 \pm 0,25$ <sup>cA</sup>
II	278	1368	$4.92 \pm 0.40$ <sup>bB</sup>	192	1132	$5.90 \pm 0,42$ <sup>bA</sup>
III	278	2148	$7.73 \pm 0.56$ <sup>aB</sup>	192	2241	$1.67 \pm 0,67$ <sup>aA</sup>
IV	278	463	$1.67 \pm 0.15$ <sup>dA</sup>	192	377	$1.96 \pm 0,16$ <sup>dA</sup>
V	278	20	$0.07 \pm 0.03$ <sup>fA</sup>	192	23	$0.12 \pm 0,04$ <sup>fA</sup>
VI	278	205	$0.74 \pm 0.08$ <sup>eA</sup>	192	175	$0.91 \pm 0,10$ <sup>eA</sup>
VII	278	96	$0.35 \pm 0.05$ <sup>fA</sup>	192	105	$0.55 \pm 0,09$ <sup>efA</sup>
Total	278	5091	$18.31 \pm 1.46$ <sup>B</sup>	192	4752	$24.75 \pm 1.73$ <sup>A</sup>

<sup>A,B</sup> - Values with different letters in the same row are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>a,b</sup> - Values with different letters in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

Tremendous progress has been made over the last decades in the selection of Nellore cattle in Brazil. This breed is characterized by the presence of six major bulls that contributed about 20% of genes in the formation of Brazilian Nellore cattle (14). Nellore cows derived from two lineages were evaluated to determine the number and quality of oocytes aspirated. To our knowledge, this is the first report to demonstrate a direct influence of the both maternal and paternal lineage of oocyte donors on yield and quality of COCs recovered by OPU in Nellore cows, with both parameters being affected by maternal and paternal lineage.

Many investigations on OPU have been made in several breeds, but the main efforts have been addressed to verify the influence of several nongenetics factors affecting the oocyte production and quality. Only few reports focusing on possible differences among breeds have also been reported (15). Individual variations as a result of specific and unspecific factors (5) limit the attainment of a satisfactory number of oocytes as well as oocytes with enough quality to develop in vitro after in vitro fertilization (16).

In the present study, by analyzing the results for the different combinations of lineages, it turns out that there was a greater number of oocytes recovered from donors of lineage Taj-Mahal (maternal and paternal; Tp-Tm). This beneficial genetic effect seems to occur from the maternal lineage Taj-Mahal, as well as through the combination of animals from the same lineage (Kp-Km), as evidenced by similar number of aspirated oocytes when these lineages were combined together. Giving support for this hypothesis, when the paternal lineage Taj-Mahal was combined with the maternal lineage Karvadi the number of recovered oocytes was significantly lower, suggesting the influence of lineage in the establishment of a quantitative trait associated to a higher availability of female gametes during OPU procedures.

The lack of more specific information makes the comparative analysis difficult. Reports focusing on genetic factors in OPU-IVP programs are very limited (2). However, Machado et al. (17) studying the variability of OPU/IVP from monozygotic twins cows found much less variation within twin-pairs than among nonrelated cattle; they suggested the presence of genetic component and heritability of these traits. Merton et al. (2) reported, for the first time, data on heritability and genetic correlations for COCs quantity and quality.

Brüggerhorff et al. (8) reported that the number of total COCs recovered per session from two lineages of Simmental Fleckview recipients (A and B) used for somatic cell nuclear transfer (SCNT) were higher for lineage A than B ( $8.2\pm 0.8$  versus  $4.2\pm 0.5$ ). According to these authors the number of total recovered COCs was significantly affected by the individual donor within each maternal lineage and paternal lineage had a high influence on the fusion rates and the number of transferable embryos after SCNT. Merton et al. (2) found moderate heritability (0.16 to 0.40) for the numeric trait (number of COCs) and low heritability for the proportional traits (quality of COCs) with number of COCs varying from 9.2 to 26.0 per session. Mahli, Adams and Singh (18) reported that related animals (mother-daughter pairs) develop equal numbers of follicular waves (two or three) during the estrous cycle. In accordance with the mentioned results

In agreement with the mentioned findings, when the morphological distribution of oocytes (grades I to VII) and the lineage of donors cows were taken in consideration, more COCs ( $P < 0.05$ ) of grades I, II, and III were found for donors originated from maternal lineage Taj-Mahal than for cows derived from maternal lineage Karvadi. These results were not observed for donors Taj-Mahal and Karvadi of paternal origin, to which the total number of oocytes (grades I to III) were not significantly different. Similarly, the total production of oocytes (grades I to VII) was superior for cows belonging to maternal lineage Taj-Mahal ( $24.75\pm 1.73$ ) than for animals from maternal lineage Karvadi ( $18.33\pm 1.46$ ). This effect was not observed for paternal lineages Taj-Mahal and Karvadi. These findings clearly show an effective genetic influence on the production of better-quality oocytes (grades I to III), as well as on the total number of oocytes, mediated by the maternal lineage of the cow.

The results found in our study are in contrast with those reported by Merton et al. (2) that observed a low heritability (0.09) for quality of oocytes, suggesting that variation in distribution of COCs among different categories based on cumulus investment is mainly influenced by nongenetics factors. According to George and Anderson (19), it is a challenge elucidating the mechanisms that determinate the genetic variation of economic interest characteristics in farm animals, once they generally are influenced by the environment and are under the control of many genes. However, as the number of COCs (OPU) and the number of oocytes and embryos (MOET) share the same biological background (number of follicles present in an ovary), it is reasonable to expect a similar heritability of these traits as well (2). The significant difference for the number of oocytes recovered between the two lineages may suggest that this quantitative trait is under polygenic control with additive effects on the performance of cow donors from lineage Taj-Mahal.

The possibility of identification for these traits through a study of QTL should be considered. Evidences found in ovine demonstrate the existence of genes that affect the reproductive performance such as the gene *FecB*, which was identified in Booroola sheeps in Australia (13). Relevant advancements have been observed in the last decades in relation to the application of the molecular genetics in the *loci* identification and regions of the chromosome containing genes that affect the production characteristics in farm animals (9). Through the QTL, several traits of economic interest, such as milk production (20) and ovulation rate in cows (12) have already been identified in the bovine genome. Thus, advancements in the molecular genetics field will allow the identification of genes and their proteins, which are expressed during different development stages of the oocyte follicle (21).

## CONCLUSION

We demonstrated here for the first time a genetic variation between two lineages of Nelore cows which influenced the number and quality of COCs recovered through ultrasound-guided follicular aspiration. Based on these experimental conditions, the lineage Taj-Mahal provided more oocytes and of better quality in comparison with lineage Karvadi. Moreover, maternal lineage seems to be the main factor to influence the production of oocytes. Further genetic investigations are required to better understand the contributions of these findings and leads encouragement to optimize OPU-PIV in bovine.

## REFERENCES

1. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TAM, Taverne MAM. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. 1988;62:1459-64.
2. Merton JS, Ask B, Onkundi DC, Mullart E, Colenbrander B, Nielen M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up- in vitro production embryo-production program. *Theriogenology*. 2009;72:885-93.
3. Calegari RS, Pachcoal DM, Martins Jr A. Aspiração folicular em vacas Nelore: efeitos da idade da doadora e época do ano sobre a produção e qualidade dos oócitos. *Acta Sci Vet*. 2006;34:477.
4. Rizos D, Burke L, Duffy P, Wade M, Mee JF, O'Farrell K, et al. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. *Theriogenology*. 2005;63:939-49.
5. Armstrong DG, McEvoy TG, Baxter G, Robinson JJ, Hogg CO, Woad, KJ, et al. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: association with the ovarian Insuline-like growth factor system. *Biol Reprod*. 2001;64:1624-32.
6. Takuma T, Sakai S, Ezoe D, Ichimaru H, Jinnouch T, Kaedei Y, et al. Effects of season and reproductive phase on the quality, quantity and developmental competence of oocytes aspirated from Japanese Black cows. *J Reprod Dev*. 2010;56:55-9.
7. Manik RS, Singla SK, Palta P. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. *Anim Reprod Sci*. 2003;76:155-61.
8. Brüggerhoff K, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, Reichenbach H, Prella K, Schemthaner W, et al. Bovine somatic cell nuclear transfer using recipient oocytes recovered by ovum pick-up: effect of maternal lineage of oocyte donors. *Biol Reprod*. 2002;66:367-73.
9. Deckers JCM. Commercial application of marker and gene assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J Anim Sci*. 2004;82:313-28.
10. Van Wagendonk-de Leeuw AM. Ovum pick up and in vitro production in yhe bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*. 2006;65:914-25.
11. Zhang Q, Boichard D, Hoeschele I. Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbreed pedigree. *Genetics*. 1998;149:1959-73.

12. Arias J, Kirkpatrick B. Mapping of bovine ovulation rate QTL; an analytical approach for three generation pedigrees. *Anim Genet.* 2004;35:7-13.
13. Davis GH, Montgomery GW, Allison AJ. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *N Z J Agric Res.* 1982;25:525-9.
14. Magnabosco CU, Cordeiro CMT, Trovo JBF, Mariante AS, Lôbo RB, Josahkian LA. Catálogo de linhagens do germoplasma zebuino: raça Nelore. Brasília: Embrapa-Cenargen; 1997.
15. Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology.* 1998;49:657-65.
16. Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology.* 2000;53:11-20.
17. Machado SA, Reichenbach HD, Weppert M, Wolf E, Gonçalves PB. The variability of ovum pick-up response and in vitro embryo production from monozygotic twin cows. *Theriogenology.* 2006;65:573-83.
18. Malhi P, Adams GP, Singh J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biol Reprod.* 2005;73:45-53.
19. Georges M, Andersson L. Positional identification of structural and regulatory quantitative trait nucleotides in domestic animal species. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 2003;68:179-88.
20. Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportions of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod.* 2007;22:1687-95.
21. Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci.* 2003;78:203-16.

**Recebido em: 25/05/11**

**Aceito em: 22/08/12**

## EFFICACY OF FINE NEEDLE ASPIRATION IN THE DIAGNOSIS OF SPONTANEOUS MAMMARY TUMORS

Marcia Moleta Colodel<sup>1</sup>  
Isabelle Ferreira<sup>1</sup>  
Fernanda Carmelo Figueiroa<sup>1</sup>  
Noeme Sousa Rocha<sup>2</sup>

### ABSTRACT

The cytopathology exam has been utilized to diagnose mammary disorders in female dogs. The success of cytopathology results depends on, among other factors, the diagnostic accuracy of the exam. The present study aimed to compare the cytopathological and histopathological findings from mammary disorder cases in female dogs and evaluate the lesion cytopathology exam accuracy. The concordance degree was evaluated between the cytopathology and histopathology exams of 67 female dogs, carriers of palpable breast lumps, cared for at the university hospital from which the following indicators were calculated: sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, false positives, false negatives, and exam accuracy. The sensitivity was 95.23%, the specificity 75%, positive predictive value 98.36%, negative predictive value 60%, and accuracy 94.02%. There were 2 false negatives and 1 false positive. In conclusion the cytopathology exam can be amply utilized as a means of diagnosis with high accuracy and sensitivity in the first examination of female dogs with mammary tumors.

**Keywords:** cytopathological diagnosis, accuracy, mammary tumor, female dogs.

## EFICÁCIA DA CITOLOGIA ASPIRATIVA NO DIAGNÓSTICO DE TUMORES MAMÁRIOS ESPÔNTANEOS

### RESUMO

O exame citológico tem sido utilizado no diagnóstico das afecções mamárias das cadelas. O êxito no resultado da citologia dependerá, além de outros fatores, da acurácia diagnóstica deste exame. O objetivo deste estudo foi comparar os achados citológicos e histológicos das afecções mamárias de cadelas e avaliar a acurácia do exame citológico nestas lesões. Avaliou-se o grau de concordância entre os exames citológico e histológico de 67 cadelas, portadoras de nódulo mamário palpável, atendidas em um hospital universitário e foram calculados os indicadores: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, falso positivo, falso negativo e acurácia do exame. A sensibilidade foi de 95,23%, a especificidade de 75%, o valor preditivo positivo de 98,36%, o valor preditivo negativo de 60% e a acurácia de 94,02%. Ocorreu 1 resultado falso positivo e 2 falso negativos. Concluiu-se que o exame citológico pode ser amplamente utilizado como meio de diagnóstico com elevada acurácia e sensibilidade no atendimento primário das cadelas com tumor de mama.

**Palavras-chave:** diagnóstico citológico, acurácia, tumor de mama, cadela.

<sup>1</sup> Doctoral Candidate in Area of Veterinary Clinics, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP.

<sup>2</sup> Associate Professor of the Department of Veterinary Clinics, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP.

**Corresponding author:** Marcia Moleta Colodel – Serviço de Patologia Veterinária, Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu - Distrito de Rubião Júnior., s/n, CEP: 18.618-970 - Botucatu, São Paulo, Brasil - e-mail: mmc@fmvz.unesp.br

## LA EFICACIA DE LA ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA EN EL DIAGNÓSTICO DE TUMORES MAMARIOS ESPONTÁNEOS

### RESUMEN

El examen citológico se ha usado en el diagnóstico de cáncer de mama en perras. El éxito de la citología depende, entre otros factores, la precisión diagnóstica de este examen. El objetivo de este estudio fue comparar los resultados de citología y examen histológico de las enfermedades de mama en las perras y evaluar la exactitud de la citología de estas lesiones. Se evaluó el grado de acuerdo entre los exámenes citológicos e histológicos de 67 perros, que sufren de bulto palpable en la mama atendidos en un hospital universitario y se calcularon los indicadores: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, falsos positivos, falsos negativo y exactitud de la prueba. La sensibilidad fue del 95,23%, especificidad 75%, valor predictivo positivo del 98,36%, valor predictivo negativo del 60% y el 94,02% de precisión. Hubo un resultado positivo falso y dos falsos negativos. Se concluye que el examen citológico puede ser ampliamente utilizado como una herramienta de diagnóstico de alta precisión y sensibilidad en la atención primaria de perros con cáncer de mama.

**Palabras clave:** diagnóstico citológico, la precisión, el tumor de mama, perra

### INTRODUCTION

When a mammary disorder is discovered, the analysis of the patient is based on the clinical history and the physical and imaging exams; most of the time these analyses are not sufficient to characterize the tumor as benign or malignant. In these cases, the cytopathological exam has been used to clear the primary diagnosis from the mammary lesion. The cytopathology exam consists of the microscopic analysis of the morphological alterations of individual cells spread onto histological slides, fixed and stained. The cells can be obtained by exfoliation or by puncture (1, 2).

Cytopathology by puncture, as a diagnosis instrument, was used initially in the mid 1920s (3, 4). The use of cytopathology by puncture in the diagnosis of the mammary disorders was not divulged in the beginning because it was believed that neoplastic cells may disseminate along the trajectory of the needle and thus affect the pathologists' ability to establish a conclusive diagnosis from the obtained material. Since the late 60's, the studies published by Franzen and Zajicek (5) have served as a basis to reveal and reintroduce this method, on a worldwide scale, as a means of diagnosis in mastology, which became more important with the passing of the years. At the present time it is widely accepted as one of the screening exams for women's mammary lesions; and has been used for diagnosis of mammary lesions in female dogs (6-10).

Cytopathology by puncture is a low-cost minimally invasive method of diagnosis utilized to differentiate between neoplastic and non-neoplastic lesions and between benign and malignant mammary tumors. The results obtained from the appropriate use of this method enable reduction in the number of invasive biopsies and lead to a faster therapeutic procedure that would reveal a more appropriate prognosis, thus avoiding many unnecessary surgical interventions (2, 10-14).

The most important causes of failure in the use of the cytopathological exam to diagnose mammary disorders are the frequencies of unsatisfactory material, the number of false-negative results and the number of false-positive results (8, 12, 13, 15). Therefore, appropriate cytopathology training and nuclear malignancy criteria (for example, Papanicolaou staining) as well as good samples of representative areas of the lesion – without

necrosis or inflammation and stained by methods that show ample evidence of cytoplasmic malignancy criteria (for example, Giemsa staining) –are all essential to obtaining clinically important cytopathological results (5, 9, 14).

Additionally, the success of the cytopathological diagnosis of mammary tumors depends on the incisiveness of the diagnosis, in other words, one's precision in diagnosing the mammary lesion cases correctly. For that reason, studies have been performed to compare the preoperative cytopathological exam with the histopathological study of the corresponding surgical specimen in order to determine the efficiency, sensitivity and specificity of this method for diagnosing mammary tumors in female dogs, criteria that varied, respectively from 63 to 92.9%, 65 to 88.6% and 83 to 100% (9-14).

Therefore, given that the cytopathological exam as an important procedure in the investigation of the mammary lesions and that there is considerable variation in the accuracy of the method, which must always be well established so that the results of a test can be reliable, the present study aimed to compare the cytopathological and histopathological findings in mammary disorders of female dogs cared for at the School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry (FMVZ) at the São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, and to evaluate the accuracy of the cytological exam in these lesions.

## MATERIAL AND METHODS

From the animals cared for at the FMVZ hospital, UNESP, Botucatu, São Paulo, 67 female dogs were selected, all of which were bearers of a tangible nodule on the inguinal or abdomen caudal mammary gland.

The tumors from the selected female dogs were submitted to the cytopathological exam. For cytopathological analysis, samples of different points from the affected mammary glands were obtained by cyto-puncture with or without suction using hypodermic needle 22 G 1/4" (Injex®, São Paulo, Brazil) and a 10 ml syringe (Injex®, São Paulo, Brazil). The collected material was spread onto histological slides, fixed with methanol p.a. (Merck®, Darmstadt, Germany) and ethanol 95% (Merck®, Darmstadt, Germany) and stained by May-Grünwald Giemsa and Papanicolaou techniques, respectively. The samples were examined via light microscopy (ZEISS - I Model AXIO Imager A1) with at 10x magnification to verify the quality control of the material, 20x to evaluate the morphological expression of the cells, and finally 40x to conclude the diagnosis. According to the malignancy criteria adopted by Allen, Prasse and Mahaffey (11) the samples were classified into 3 groups: benign lesion (mammary hyperplasia, benign epithelial tumor, benign mixed tumor), malignant (malignant epithelial tumor, malignant complex tumor, malignant mixed tumor) and inconclusive or insufficient (a smear with less than 5 cell groups, with each group containing 5 to 10 cells).

After routine procedures of anesthesia and local antiseptic the animals were submitted to mastectomy. The tumor fragments were removed and fixed in 10% buffered formalin solution and the specimens of each surgical part were processed routinely and stained with *hematoxylin* and eosin. The reading of the slides was accomplished with a light microscope (ZEISS - I Model AXIO Imager A1) and enabled the lesions to be classified as benign (adenoma and benign mixed tumor) or malignant (simple and complex carcinoma).

The only female dogs considered were those that presented an interval of less than two months between the cytopathological exam and the confirmative histological exam.

The cytopathological results for malignancy (benign or malignant) were compared with their respective histopathological diagnoses and the degree of consistency was evaluated among the exams calculating the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, false positive number, false negative number and accuracy.

In order to calculate the sensitivity, a portion of patients with malignant mammary tumor whose cytopathology results indicated malignancy were considered malignant by the

cytopathological exam when they presented at least three of the malignancy criteria adopted by Allen, Prasse and Mahaffey (11), confirmed by the histopathology. The mammary tumors recognized by histopathology as malignant that were not diagnosed as such in the cytopathology were considered false negatives.

To calculate the specificity, the portion of patients with benign mammary lesions whose cytopathology results were benign were those who presented the absence of at least three malignant criteria according Allen, Prasse and Mahaffey (11) in the cytopathological evaluation, confirmed by histopathology. The mammary tumors recognized by the histopathology as benign that were diagnosed as malignant in the cytology were considered false positives.

The positive predictive value was calculated based on the probability of the mammary lesion being malignant via histology when the cytology result was malignant whereas the negative predictive value was the probability that the lesion was histopathologically benign when the cytological diagnosis was benign.

The accuracy of the cytological exam corresponds to the proportion of cases correctly diagnosed by cytopathology.

## RESULTS

Among the 67 tumors tested by cytopathology (Table 1), the distribution showed that most of the female dogs (n=61; 91.04%) presented malignant tumors; 5 female dogs (7.46%) were bearers of benign tumors and in only 1 case (1.50%) the material was considered unsatisfactory for analysis (which was diagnosed as a malignant tumor via histopathology). In what is referred to as the histopathological study, the following results were observed: 63 female dogs (94.03%) presented malignant tumors while 4 (5.97%) bore benign tumors.

The cytopathological analysis identified 1 hyperplastic nodule (1.49%), 2 benign epithelial tumors (2.98%), 2 benign mixed tumors (2.98%), 11 compound malignant tumors (16.42%), 25 malignant epithelial tumors (37.32%), 25 malignant mixed tumors (37.32%) and 1 case of insufficient material (1.49%), totaling 67 cases. The histological study verified 2 adenomas (2.98%), 2 mixed benign tumors (2.98%), 26 simple carcinomas (38.81%) and 37 complex carcinomas (55.23%). In some samples observed there was an inflammatory component associated with the neoplasm process.

Table 1. Distribution of the cytopathological results by histopathological malignancy diagnosis of the 67 studied mammary tumors, selected at the FMVZ hospital, UNESP, Botucatu, São Paulo.

Histopathological Diagnosis	Cytopathological Diagnosis			Total
	Benign	Malignant	Insufficient	
Benign*	3	1	0	4
Malignant**	2	60	1	63
Total	5	61	1	67

\* Adenoma and benign mixed tumor

\*\*Simple carcinoma and complex carcinoma

The distribution of the cytopathology results according to the histopathological diagnosis of the mammary tumors studied is displayed in Table 1. The cytopathological method presented a sensitivity of 95.23%, specificity of 75%, positive predictive value of

98.36%, negative predictive value of 60% and accuracy of 94.02%. In addition to 2 false negatives, there was 1 false positive result.

## DISCUSSION

Cytopathology by puncture was introduced in medical practice after modifications of the standard methodology of exfoliation cytology, developed by Doctor Georgios Papanicolaou in the middle of the 19th century (1). With the success of the technique it increased in use and there was significant improvement in the preparation and interpretation of the punctured material in several disorders, besides is used in the clinical setting for mammary lesions in female dogs (6, 7, 9, 10).

In order to obtain such selectivity, the cytopathological evaluation in combination with, the clinical evaluation of the female dogs carriers of mammary tumors, has been used as a diagnosis instrument by the Service of Veterinary Pathology of FMVZ, UNESP, Botucatu since 1994. Such collected data provided us a validated basis for a better filing of the information obtained in this study.

In the population studied, the correlation between the cytopathological and histopathological exams showed that the sensitivity of the cytopathological exam is high (95.23%), while defining positivity as the presence of malignant mammary tumors. However, its specificity (75%) is below the value considered appropriate, indicating that some female dogs would be diagnosed falsely as bearers of malignant mammary tumors; however, its high sensitivity means that practically all the malignant tumors would be detected.

Since the high sensitivity of the cytopathological exam for the malignancy diagnosis was influenced by the low false negative rate (4.77%), it can be inferred that the cytopathology result will rarely be negative in the presence of a malignant mammary tumor and that, in these cases, a therapeutic intervention and prognosis will be more precise. The false negative results indicate omission of malignant cases and can be attributed mainly to inadequate sampling but also to failure in the interpretation of the material (10, 14). In this study, several samples of the same nodule were collected and submitted to both staining techniques, Giemsa and Papanicolaou, which provided appropriate material, good visualization and interpretation of the cellular components and possibly contributed to the low percentage of false negatives in the cytopathological diagnosis.

The method's specificity may present a different percentage if the number of benign tumor samples were larger. However, it could be said that its sensitivity depends on the occurrence of false positive results which are almost exclusively attributable to mistakes in interpreting the sample, commonly related to the lack of experience, negligence and use of low quality staining techniques (8, 15). This can also be related to the presence of cellular atypia caused by active inflammation (2, 12). Therefore when present, it is suggested to reduce the inflammatory process and, if necessary, to acquire a new puncture (11, 13). So as to avoid the tendency of overestimation of the results that can be responsible for more invasive or unnecessary interventions (5). The inflammatory component present in the smear of this study was certainly shown to be a negative factor in the accurate diagnosis of the benign lesion falsely diagnosed as malignant.

The presence of unsatisfactory material can be attributed partly to the cellular inadequacy or technical mistakes during the obtainment and processing of the sample. Inexperience of the professional performing the examination, previous treatments or lipomatous, fibrocystic or hemorrhagic lesions can, in the cyto-puncture, result in scarce and thus insufficient material (2, 11, 12). In all the analyzed cases puncturing the center of the tumors was avoided, in order to reduce the risk of collecting necrotic material, in favor of puncturing several areas of tumor formation. Therefore, the possibility of obtaining low quality material (red blood cells, necrosis) was minimized.

The positive and negative predictive values found in the studied population were 98.36% and 60%, respectively, which represents a chance of approximately 99% that female dogs with a positive diagnosis of malignancy will actually present a malignant mammary tumor and a 60% probability that female dogs diagnosed as negative for malignancy will actually not present mammary cancer. The predictive values of the test refer only to the studied population (n=67), in other words, the patients assisted in FMVZ, UNESP at Botucatu, whose cytopathological exam was confirmed by the histopathological exam according to the established criterion. Nevertheless, the sensitivity and specificity of a test are exclusive properties of the tests' diagnosis and do not vary considerably when establishing other study criteria, unless there are changes in the technique or mistakes in application (16). Thus, in spite of possibly overestimating benign cases, the 94.02% accuracy signifies a high capacity for correct diagnosis and demonstrates that the cytopathological exam, when conducted in an appropriate manner, can be indicated as a fast, early and effective method for the diagnosis of mammary lesions in female dogs.

The results of this and of other studies (9-14) allow to characterize the cytopathological method as being easily executed, faster than histopathology, and having sensitivity equal or superior to the biopsy methods.

## CONCLUSIONS

Therefore, cytopathology can be widely utilized as a method of diagnosis with high accuracy and sensitivity in the first examination of female dogs with mammary tumors, mainly for the diagnosis and surgical planning in relation to malignant mammary tumors, and thus enables treatment through only a single intervention without the necessity of additional interventions to obtain safe margins. However, its result should not be the only diagnosis instrument in the mammary lesion cases. Instead, the clinical, imaging and, subsequently, histopathology findings should also be taken into account.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to The State of São Paulo Research Foundation – FAPESP (Process 2009/52748-3) for their financial support.

## REFERENCES

1. Rocha NS. Exame citológico no diagnóstico de lesões da pele e subcutâneo. *Clin Vet.* 2008;76:76-80.
2. Raskin RE, Meyer DJ. *Canine and feline cytology - a color atlas and interpretation guide.* 2a ed. Philadelphia: Saunders; 2009.
3. Dudgeon LS, Patrick CV. A new method for rapid microscopical diagnosis of tumors. *Br J Surg.* 1927;15:250-61.
4. Martin HE, Ellis EB. Biopsy by needle puncture and aspiration. *Ann Surg.* 1930;92:169-81.
5. Franzen S, Zajicek J. Aspiration biopsy in palpable lesions of the breast. Critical review of 3479 consecutive biopsies. *Acta Radiol Ther Phys Biol.* 1968;7:241-62.

6. Castillo CA, Candanosa EA, Buen NA. Diagnóstico citológico en veterinaria, análisis de 3563 casos. *Vet Mex.* 1988;19:211-5.
7. Guedes RMC. Acurácia do exame citológico no diagnóstico de processos inflamatórios e proliferativos dos animais domésticos. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2000;52:437-9.
8. Choi Y, Lee J, Nam J, Juhng S, Choi C. Analysis of fine needle aspiration cytology of the breast: A review of 1,297 cases and correlation with histologic diagnoses. *Acta Cytol.* 2004;48:801-6.
9. Simeonov R, Stoikov D. Study on the correlation between the cytological and histological tests in the diagnostics of canine spontaneous mammary neoplasms. *Bulg J Vet Med.* 2006;9:211-9.
10. Simon D, Schoenrock D, Nolte I, Baumgärtner W, Barron R, Mischke R. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Vet Clin Pathol.* 2009;38:521-8.
11. Allen SW, Prasse KW, Mahaffey EA. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 1986;23:649-55.
12. Hellmén E, Lindgren A. The accuracy of cytology in diagnosis and DNA analysis of canine mammary tumours. *J Comp Pathol.* 1989;101:443-50.
13. Zuccari DAPC, Santana AE, Rocha NS. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histopatologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2001;38:38-41.
14. Cassali GD, Gobbi H, Malm C, Schmitt FC. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology.* 2007;18:191-6.
15. Chaiwun B, Settakorn J, Ya-In C, Wisedmongkol W, Rangaeng S, Thorner P. Effectiveness of fine-needle aspiration cytology of breast: Analysis of 2,375 cases from Northern Thailand. *Diagn Cytopathol.* 2002;26:201-5.
16. Dibonito L, Falconieri G, Tomasic G, Colautti I, Bonifacio D, Dudine S. Cervical cytopathology: an evaluation of its accuracy based on cytohistologic comparison. *Cancer.* 1993;72:3002-6.

**Recebido em: 03/02/11**

**Aceito em: 24/08/12**

## SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS EM PASTAGENS DE CAPIM XARAÉS NOS PERÍODOS DE SECA E TRANSIÇÃO SECA-ÁGUAS

Daniel Marino Guedes de Carvalho<sup>1</sup>  
Luciano da Silva Cabral<sup>2</sup>  
Janaina Januario da Silva<sup>2</sup>  
Thiago Luiz Queiros Arnoldo<sup>3</sup>  
Ricardo Alessandro Baez<sup>4</sup>  
Renato Esteves Sandri<sup>4</sup>

### RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de cinco níveis de suplementação a base de resíduo úmido de cervejaria sobre o desempenho produtivo e custos da produção leiteira, durante os períodos de seca e transição seca-águas na Baixada Cuiabana – MT. Foram utilizadas cinco vacas Girolando, com aproximadamente seis anos de idade e peso inicial médio de 500 kg, distribuídas aleatoriamente em um delineamento em quadrado latino (5 x 5) com cinco períodos de 14 dias e cinco níveis de suplementação: 3,1; 3,7; 4,3; 4,9 e 5,5 kg de suplemento animal dia. Avaliação criteriosa da qualidade da pastagem comprovou a necessidade de utilização de um suplemento para evitar perdas de produção durante o período. Para os níveis de suplementação propostos no presente trabalho, o resíduo úmido de cervejaria pode ser utilizado como ingrediente sem acarretar efeitos significativos sobre a produção leiteira, entretanto, todos os níveis de suplementação utilizados geraram margem bruta positiva, sendo que, o nível de fornecimento de 3,1 kg animal dia forneceu a melhor margem bruta entre as quantidades testadas.

**Palavras-chave:** *Brachiaria brizantha*, custos, desempenho

### SUPPLEMENTATION FOR DAIRY CATTLE IN XARAÉS GRASS PASTURE IN DROUGHT AND DRY-WATER TRANSITION SEASONS

### ABSTRACT

Aimed to evaluate the effect of five levels of supplement-based brewery residue on performance and cost of milk production during drought and drought-water transition periods of Cuiabana Lowlands - MT. Five Holstein-Zebu lactating cows, with about six years old and average weight of 500 kg, were randomly distributed in Latin square 5x5 design, with five periods of 14 days and five supplementation levels: 3,1; 3,7; 4,3; 4,9 and 5,5 kg of supplement per animal day. A careful evaluation of pasture quality proved the necessity of using a supplement to avoid losses of production during that period. For the supplementation levels proposed in this work, the brewery residue can be used as an ingredient in supplements without disturbing significant effects on milk production, however, all levels of

<sup>1</sup> Professor Doutor, Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia; Estrada Macurany nº 1805; Bairro: Jacareacanga, Cep:69.152-240, 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@hotmail.com)

<sup>3</sup> Agrônomo Mestrando em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina veterinária e Zootecnia, Programa de pós graduação em Ciência animal. Avenida Fernando Correia da costa nº 2367; Bairro: Boa esperança, Cep: 78.060-900, Cuiabá – MT, (tiagoarnoldo@hotmail.com)

<sup>4</sup> Graduação em Agronomia, Universidade de Cuiabá, Faculdade de Agronomia, Avenida Beira Rio, S/N, Cep:78.800-000, Cuiabá-MT (baez@gmail.com; renatosandri@hotmail.com)

supplementation used generated positive gross margin, so that the level of supply of 3,1 kg animal day provided better gross margin between the amounts tested.

**Keywords:** *Brachiaria brizantha*, performance, costs

## SUPLEMENTACIÓN DE VACAS LECHERAS MANTENIDAS EN PASTO INSURGENTE DURANTE LOS PERÍODOS DE ESTIAJE Y TRANSICIÓN SEQUÍA-LLUVIA

### RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de cinco niveles de suplementación a base de residuos húmedos de cervecería sobre el rendimiento y los costos de producción de la leche durante los períodos de estiaje y de transición sequía-lluvia en el pantano seco de Cuiaba – Mato Grosso. Fueron utilizadas cinco vacas de raza Girolando, con aproximadamente seis años de edad y peso inicial de 500 kg, separadas al azar en un diseño de cuadrado latino (5 x 5) en cinco períodos de 14 días y cinco niveles de suplementación: 3,1, 3,7, 4,3, 4,9 y 5,5 kg, de suplemento por animal por día. La evaluación cuidadosa de la calidad de los pastos demostró la necesidad de usar un suplemento para evitar pérdidas en la producción durante este periodo. El residuo húmedo de cervecería, puede ser utilizado como un ingrediente que, si bien no causa efectos significativos en la producción de leche, trae consigo aumento bruto positivo en todos los niveles de suplementación, siendo 3.1 kilos por animal por día la mejor cantidad entre los valores experimentados.

**Palabras clave:** *Brachiaria brizantha*, costos, desempeño

### INTRODUÇÃO

A unidade Depressão Cuiabana refere-se à área topograficamente rebaixada, com altitudes entre 200 e 450 m. Atualmente, a região com tradição na produção de carne bovina tem visto a pecuária leiteira tornar-se a principal atividade para muitos produtores.

O Cerrado, bioma característico da região, fornece condições para que os animais sejam criados em áreas nativas ou sobre pastagens cultivadas. Os pastos nativos exibem extrema variabilidade espacial e temporal. A variabilidade pode ser natural (estagio fenológico) ou induzida pelo pastejo (ações dos próprios animais) (1). As pastagens plantadas também estão sujeitas à estacionalidade de produção, principalmente, pelos baixos índices pluviométricos da região nos períodos de outono e inverno.

Nessas condições, é de vital importância o acompanhamento da qualidade da dieta ingerida pelos animais e implementar, quando necessário, estratégias de manejo alimentar para evitar perdas na produção. Uma alternativa para os períodos adversos de oferta de forragem é a suplementação, entretanto, esta medida está atrelada a acréscimos ao custo de alimentação dos rebanhos. Sendo assim, a escolha de ingredientes com baixo custo, porém, com alto valor nutricional, garante a formulação de um suplemento eficaz no fornecimento de nutrientes limitantes, com custo viável para o produtor.

A substituição de alimentos tradicionais na composição dos suplementos, como o milho e a soja, por co-produtos da indústria alimentícia e dos biocombustíveis tem se tornado realidade em muitas propriedades da Depressão Cuiabana.

O resíduo úmido de cervejaria é obtido pelo processo de fabricação de cerveja, o que envolve a obtenção do malte, onde os grãos de cevada são imersos em água morna que em seguida é retirada para que ocorra a germinação dos grãos e a hidrólise do amido em dextrina e maltose, que são posteriormente extraídos (2).

É sabido que este material é rico em proteína bruta (podendo ultrapassar 30%), sendo a maior parte desta não degradada no rúmen e, quando utilizado em até 15% na dieta de bovinos, não acarreta prejuízos no consumo de matéria seca e nas condições de fermentação ruminal (3).

Objetivou-se avaliar níveis de suplemento a base de resíduo úmido de cervejaria sobre o desempenho produtivo e custos da produção leiteira, durante os períodos de seca e transição seca-águas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nas dependências da Chácara Capão Grande, localizada a 20 km de Cuiabá, no município de Várzea Grande - MT, na Depressão Cuiabana, durante os meses de setembro a novembro de 2008, correspondendo ao período da seca e transição seca-águas, perfazendo 70 dias experimentais, divididos em cinco períodos de 14 dias.

A área foi constituída por cinco piquetes de 0,5 ha cada, formados pela gramínea *Brachiaria brizanta* cv. Xaraés, providos de bebedouros e cochos.

Foram utilizadas cinco vacas Girolando, com aproximadamente seis anos de idade e peso inicial médio de 500 kg. Os níveis de suplementação avaliados foram: 3,1; 3,7; 4,3; 4,9 e 5,5 kg de matéria seca por animal dia. A Tabela 1 apresenta a composição do suplemento com base na matéria natural.

Tabela 1. Composição do suplemento na matéria natural

Ingredientes	Quantidades (kg)
Resíduo úmido de cervejaria	78,00
Casca do grão de soja	9,00
Milho grão moído	10,00
Mistura mineral <sup>1</sup>	3,00
Total	100,00

<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.

As quantidades de suplemento correspondentes aos cinco tratamentos foram divididas, de tal forma que cada animal recebeu a mesma quantidade de suplemento pela manhã (6:00 h) e à tarde (16:00 h), durante as ordenhas. As sobras de suplemento foram monitoradas durante todo período. Os animais foram ordenhados manualmente sempre pelo mesmo ordenhador de modo a diminuir a variabilidade dos resultados.

Os 11 primeiros dias de cada período experimental foram destinados à adaptação dos animais aos tratamentos. Nos 12º, 13º e 14º dias foram mensuradas as produções de leite, por meio da pesagem individualizada do leite em balança digital.

No primeiro dia do primeiro, terceiro e quinto períodos experimentais foram colhidas amostras de pasto em cinco áreas escolhidas aleatoriamente nos diferentes piquetes por meio do corte, a 5 cm do solo, com auxílio de quadrado metálico de 0,5 x 0,5 m. Após a coleta, as amostras de cada piquete foram pesadas e homogeneizadas, e a partir destas, retiraram-se duas alíquotas compostas: uma para avaliação da disponibilidade total de massa seca (MS/ha) e outra para análise das disponibilidades por hectare de: massa seca de lamina foliares verdes, laminas foliares secas, colmo verdes e colmo secos.

A avaliação da forragem ingerida pelos animais foi realizada utilizando-se a técnica de simulação de pastejo, colhendo amostras de pasto em duas linhas diagonais dentro de cada piquete, no primeiro dia de cada período experimental. Procurou-se manter sempre os

mesmos amostradores para reduzir a variabilidade dos resultados. O material colhido foi imediatamente congelado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise de laboratório.

Amostras dos ingredientes, suplementos e forragem foram analisadas no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal de Mato Grosso, 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), conforme metodologia descrita em Silva e Queiroz (4).

Na avaliação econômica, para estimativa do custo diário da forragem (R\$/dia) foi considerado o valor de arrendamento de uma pastagem de R\$ 10,00 animal/mês dividido por 30 dias de duração de cada mês. A receita diária (R\$/dia) foi obtida multiplicando-se a produção diária de leite pelo valor pago por kg de leite. O custo do suplemento (R\$/dia) foi obtido multiplicando-se o consumo diário de suplemento pelo custo do kg de suplemento. O custo diário (R\$/dia) foi obtido pela adição dos custos da suplementação e da forragem. A margem bruta foi calculada pela diferença entre a receita e o custo total (suplemento e forragem).

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

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \epsilon_{ijk}$$

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  $5$ );  $\gamma_k$  = efeito referente ao período experimental  $k$  ( $k = 1, 2, 3, 4$  e  $5$ ); e  $\epsilon_{ijk}$  = erro aleatório, associado a cada observação, pressuposto NID ( $0, \sigma^2$ ).

Os dados foram analisados por meio de análise de variância e regressão, sendo todas as análises realizadas por intermédio do programa SAEG/UFV (5), tendo-se adotado o nível de probabilidade de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As disponibilidades de massa seca total (MST), de folhas verdes (MSFV), de folhas secas (MSFS), de colmos verdes (MSCV) e de colmos secos (MSCS) nas pastagens, em cada um dos períodos experimentais estão dispostas na Figura 1. Foram observados valores médios de disponibilidade de MST, MSFV, MSFS, MSCV e MSCS de 3,00; 0,49; 0,98; 0,84 e 0,68 t/ha, respectivamente.

O comportamento dos dados de disponibilidade encontrado está de acordo com os observados por Carvalho et al. (6), em pastagem de *Brachiaria brizanta* cv. Marandu. Os baixos valores encontrados para a variável MSFV para os meses de outubro e novembro, são reflexo da baixa taxa de crescimento das forrageiras no período da seca somados a capacidade seletiva dos animais, que consomem preferencialmente folhas verdes em relação aos colmos, na tentativa de consumir uma dieta mais adequada as suas exigências nutricionais.

A pequena quantidade das frações botânicas folhas verdes (MSFV) obtidas no período experimental como um todo corroboram com Cecato et al. (7). Estes autores afirmaram que no período de seca praticamente não há crescimento de pastagem, pois, as taxas de alongamento e aparecimento foliar, de alongamento das hastes e o tempo de vida da folha são significativamente afetados pelos fatores abióticos, tais como, quantidade e qualidade da luz e disponibilidade de água. Assim, o balanço final do processo morfogenético, em acúmulo de forragem, é o resultado não da exclusividade de um evento, mas da preponderância de um fator abiótico ou, em determinada circunstância (8).

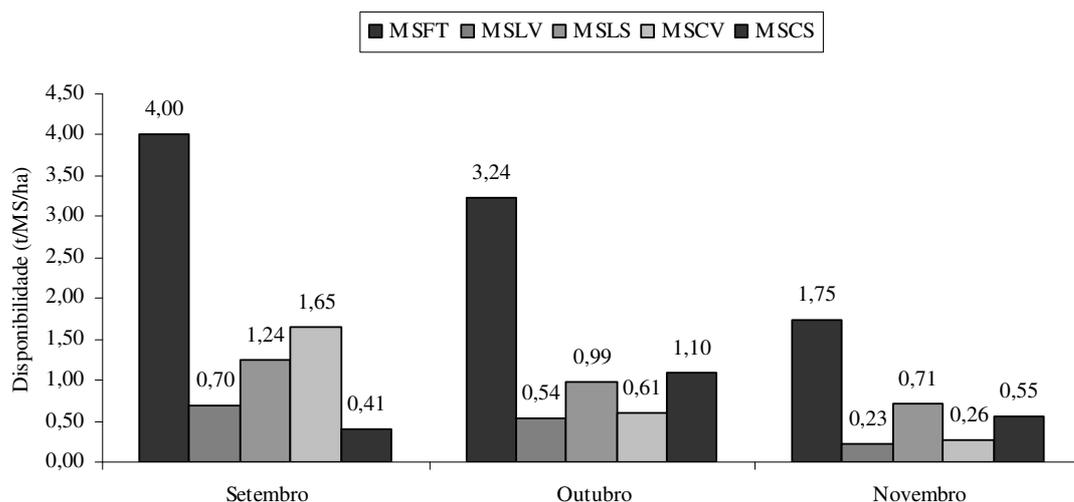


Figura 1. Massa seca de forragem total (MSFT), de lamina foliares verdes (MSLV), de lamina foliares mortas (MSLM), de colmos verdes (MSCV) e de colmos mortos (MSCM) do capim-xaraés em cada período experimental.

A quantidade de MST disponível por hectare, foi inferior à quantidade considerada por Euclides, Macedo e Oliveira (9), de 4,26 toneladas de MS/ha, como satisfatória para não suprimir a seletividade animal.

Foram observados valores médios para ofertas de massa de forragem total (OMSFT), de lâminas foliares verdes (OMSLV), de lamina foliares mortas (OMSLM), de colmos verdes (OMSCV) e de colmos mortos (OMSCM) na pastagem de 21,40; 3,50; 7,00; 6,00 e 4,90% do peso corporal (PC), respectivamente (Figura 2).

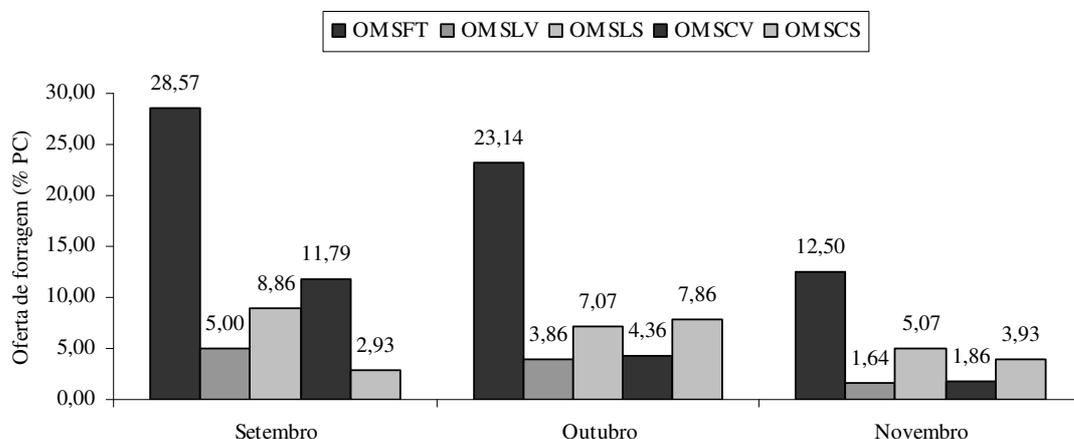


Figura 2. Ofertas diárias de massa seca de forragem total (OMSFT), de lamina foliares verdes (OMSLV), de lamina foliares mortas (OMSLM), de colmos verdes (OMSCV) e de colmos mortos (OMSCM) do capim-xaraés em cada período experimental em porcentagem do peso corporal dos animais.

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. (10) 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 buscando consumir uma dieta mais adequada as suas exigências nutricionais.

Vale ressaltar que a digestibilidade da dieta colhida pelos animais pastejando gramíneas forrageiras tropicais está em função da oferta de forragem, logo, em condições de pouca oferta, o animal apresenta menor possibilidade de seleção, enquanto que, na condição oposta o animal pode selecionar as porções mais nutritivas do pasto (lâminas foliares verdes) em detrimento aos colmos e material senescente (11).

Neste estudo, foram observados valores médios de 9,30% de PB para a forragem (Tabela 2), valor superior aos encontrados por Baião et al. (12) e Moraes et al. (13), que, analisando amostras de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu obtidas via simulação manual de pastejo no período seco (junho a setembro), obtiveram médias de 4,01 e 5,8% PB e próximos aos valores encontrados por Paulino et al. (14) e Porto et al. (15) de respectivamente 9,08 e 8,99% PB em amostras de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu obtidas via simulação manual de pastejo.

Tabela 2. Teores médios de MS, MO, PB, CZ, FDN, FDA e HEM da pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés obtidas via simulação de pastejo na Depressão Cuiabana

Itens	Meses experimentais			Média
	Setembro	Outubro	Novembro	
MS (%)	46,55	21,28	21,73	29,85
MO <sup>1</sup>	89,96	90,70	88,92	89,86
PB <sup>1</sup>	4,94	13,26	9,70	9,30
FDN <sup>1</sup>	76,69	63,49	61,62	67,27
FDA <sup>1</sup>	40,87	28,68	34,31	34,62
HEM <sup>1</sup>	35,66	34,81	36,54	35,67
CZ <sup>1</sup>	10,04	9,30	11,08	10,14

<sup>1</sup>MS, MO, PB, FDN, FDA, HEM, CZ correspondem a matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, hemicelulose e cinzas. Valores expressos em % da matéria seca.

Os valores de PB situaram-se acima do mínimo necessário (7% PB), para garantir a fermentação dos carboidratos estruturais no rúmen (16). O aumento no teor de PB da forragem nos meses de Outubro e Novembro em relação a Setembro é reflexo do aumento das chuvas oferecendo condições para rebrota da planta forrageira e aumento da quantidade de folhas verdes que concentra maior quantidade de PB, melhorando assim a qualidade nutricional da forragem disponível aos animais. O mesmo pode-se afirmar para a diminuição da FDN nos meses de Outubro e Novembro em relação a Setembro, haja vista que partes mais jovens da planta possuem menor quantidade de parede celular em relação a partes maduras como folhas secas.

O valor de FDN encontrado para a forragem foi de 67,27 % (Tabela 2), próximo aos resultados encontrados por Garcia et al. (17), com *Brachiaria decumbens*, e Moraes et al. (13), com *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, que, analisando amostras de forragem obtidas por simulação do pastejo, no período seco, obtiveram médias de 70,61 e 70,1%, respectivamente. Esses resultados reforçam a importância da adoção de suplementos na dieta das vacas leiteiras para manutenção de bons índices produtivos nesses períodos de condições mais adversas.

No presente trabalho, pode-se observar que o resíduo úmido de cervejaria é o ingrediente em maior proporção na composição do suplemento, pois optou-se pela utilização de ingredientes de baixo custo que, em contrapartida, garantissem alto valor nutricional ao

mesmo (Tabela 1). O resíduo apresentou baixo teor de matéria seca (13,94%), por isso, a denominação “resíduo úmido” e alto teor de proteína (23,95%) (Tabela 3).

Tabela 3. Teores médios de MS, MO, PB, CZ, FDN, FDA, HEM em amostras de suplemento e ingredientes, com base na matéria seca

Itens	Suplemento	Resíduo de cervejaria	Milho grão moído	Casca de soja
MS (%)	29,72	13,94	87,90	90,31
MO	88,91	97,10	98,56	95,93
PB	17,26	23,95	10,05	20,49
FDN	50,65	70,40	46,55	70,06
CZ	11,09	2,90	1,44	4,07

<sup>1</sup> MS, MO, PB, FDN, FDA, HEM, CZ correspondem a matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, hemicelulose e cinzas. Valores expressos em % da matéria seca.

Pode-se observar que a produção de leite (Tabela 4) não foi influenciada pelos níveis de suplementação ( $P>0,05$ ), com média de 13,64 kg de leite animal dia, valor considerado bom para explorações em pasto na época do estudo.

Tabela 4. Produção de leite em kg animal dia de vacas suplementadas em pasto segundo níveis de suplementação

Itens	Níveis de suplementação (kg MS animal dia)				
	3,10	3,70	4,30	4,90	5,50
Produção de leite (kg animal dia)	13,07	14,09	13,99	13,50	13,56

A falta de resposta aos níveis de suplementação utilizados pode ser atribuída ao potencial genético dos animais. Níveis de suplementação acima de 0,3% do peso vivo do animal podem causar depressão no consumo de matéria seca de forragem, mesmo com aumento no consumo de matéria seca total. Dessa forma, a não observância de diferença entre os níveis de suplementação utilizados pode ter ocorrido em função da ocorrência de efeito associativo negativo (efeito substitutivo) para todos os níveis de suplementação avaliados.

O fornecimento de concentrado é um instrumento importante para potencializar a produtividade, e nesse caso, com 3,1 kg diários de suplemento para cada animal, já maximiza a produção do sistema. Alvim, Vilela e Lopes (18), em estudos de estratégias de suplementação para bovinos leiteiros criados em pasto, também observaram comportamento semelhante entre as produções médias de leite (kg animal dia) obtidas com níveis de suplementação diferentes.

De mesmo modo, Geron e Zeoula (2) avaliaram o efeito da ausência e inclusão de 5; 10 e 15% de silagem do resíduo úmido de cervejaria na alimentação de vacas leiteiras sobre a produção de leite, coeficiente de digestibilidade dos nutrientes e viabilidade econômica. Os autores verificaram que não houve diferença estatística ( $P>0,05$ ) para produção de leite entre os níveis utilizados, entretanto, registrou-se aumento de 7,9% na produção das vacas que receberam 15% de silagem do resíduo úmido de cervejaria em relação àquelas alimentadas com ausência do resíduo na dieta (27,83 e 29,47 kg leite/dia, respectivamente).

O elevado valor nutricional, elevada disponibilidade e a não concorrência com a alimentação humana (como no caso do milho) são alguns dos motivos que incentivam a utilização do resíduo de cervejaria como ingrediente em dietas para ruminantes.

Tabela 5. Custo dos ingredientes usados na formulação, teor de proteína bruta no suplemento e composição percentual dos suplementos com base na matéria natural

Ingrediente	Valores		Suplemento (kg)
	R\$/t	R\$/kg	
Resíduo de cervejaria <sup>1</sup>	70,00	0,07	78,00
Milho moído <sup>1</sup>	350,00	0,35	10,00
Casca do grão de soja <sup>1</sup>	300,00	0,30	9,00
Mistura mineral <sup>1</sup>	1900,00	1,90	3,00
Total			100,00
Custo Suplemento (R\$/t)			173,60
Custo suplemento (R\$/kg)			0,1736

<sup>1</sup>Valores praticados no mercado local

Os custos com a alimentação dos animais aumentaram em função da adição de suplemento na dieta das vacas (Tabela 6). Em adição, houve efeito linear decrescente na margem bruta em função do aumento no nível de suplementação, apesar do aumento linear na receita. Essa diminuição na margem bruta ocorreu em função do aumento do custo de alimentação com uso de mais suplemento na dieta dos animais, concomitante à falta de resposta dos animais à suplementação.

Tabela 6. Indicadores econômicos e de custo de produção

Indicadores Econômicos	Níveis de suplementação (kg de MS)				
	3,1	3,7	4,3	4,9	5,5
Consumo suplemento (kg/dia)	3,1	3,7	4,3	4,9	5,5
Custo forragem (R\$/dia)	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
Valor pago pelo leite (R\$/kg)	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
Produção de leite (kg/dia)	13,07	14,09	13,99	13,5	13,56
Receita (R\$/dia)	7,97	8,59	8,53	8,24	8,27
Custo por dia (R\$)	2,07	2,41	2,76	3,11	3,45
Custo do leite (R\$/kg)	0,16	0,17	0,20	0,23	0,25
Margem bruta por kg de leite produzido	0,45	0,44	0,41	0,38	0,36

Vale lembrar que os custos com o suplemento estão diretamente ligados a região de inserção da propriedade rural, disponibilidade de sub-produtos agroindustriais e despesas com frete. Dessa forma o custo do suplemento é uma questão regional e circunstancial.

Segundo Vilela (19) a maior produtividade no cerrado é decorrente do menor custo de produção, em razão do menor preço de alguns insumos e da prioridade ao pasto como alimento do rebanho. Oliveira (20) avaliando diferentes volumosos e relações volumoso:concentrado também observou diminuição na margem bruta por vaca/dia em função do aumento da quantidade de concentrado na dieta dos animais.

Os resultados obtidos por Silva et al. (21) corroboram com os registrados no presente trabalho. Os autores testando a viabilidade econômica de níveis crescentes de suplementação para vacas mantidas em pastejo na região dos Campos Gerais - PR, registraram também diminuição na margem bruta por vaca/dia em função do aumento da quantidade de concentrado na dieta dos animais.

## CONCLUSÕES

O resíduo úmido de cervejaria pode ser utilizado como ingrediente para suplementação de vacas leiteiras em pastejo, com produção média em torno de 14 kg no nível de fornecimento de 3,1 kg MS animal dia por permitir maior margem bruta.

**REFERÊNCIAS**

1. O'Regain PJ. Foraging strategies on rangeland: effects on intake and animal performance. In: Peixoto AM, Faria VP, Corcy M. Proceedings of the 19<sup>o</sup> International Grassland Congress; 2001, Piracicaba. Piracicaba: FEALQ; 2001. p.277-84.
2. Geron LJV, Zeoula LM. Silagem do resíduo úmido de cervejaria: uma alternativa na alimentação de vacas leiteiras. Pubvet. 2007;1:243-53.
3. Rogers JA, Conrad HR, Dehority BA, Grubb JA. Microbial numbers, rumen fermentation and nitrogen utilization of steers fed wet or dried brewers grains. J Dairy Sci. 1986;69:745-53.
4. Silva DJ, Queiroz AC. Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos. 2<sup>a</sup>ed. Viçosa: UFV; 2002.
5. Sistema de análises estatísticas e genética - SAEG: manual do usuário. Versão 5.1. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1995.
6. Carvalho DMG, Zervoudakis JT, Cabal LS, Paula NF, Moraes EHBK, Oliveira AA, et al. Fontes de energia em suplementos múltiplos para recria de bovinos em pastejo no período da seca: desempenho e análise econômica. Rev Bras Saude Prod Anim. 2009;10:760-73.
7. Cecato U, Skrobot VD, Fakir GM, Jobim CC, Branco AF, Galbeiro S, et al. Características morfogênicas do capim-mombaça (*Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça) adubado com fontes de fósforo, sob pastejo. Rev Bras Zootec. 2007;36:1699-706.
8. Gomide CAM, Gomide JA, Alexandrino E. Características estruturais e produção de forragem em pastos de capim-mombaça submetidos a períodos de descanso. Pesqui Agropecu Bras. 2007;42:1487-94.
9. Euclides VPB, Macedo MCM, Oliveira MP. Avaliação de diferentes métodos para se estimar o valor nutritivo de forragens sob pastejo. Rev Bras Zootec. 1992;21:691-702.
10. 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.
11. Canto MW, Cecato U, Peternelli M, Jobim CC, Almeida Júnior J, Rigolon LP, et al. Efeito da altura do capim-tanzânia diferido nas características da pastagem no período do inverno. Rev Bras Zootec. 2001;30:1186-93.
12. Baião AAF, Andrade IF, Edinéia AM, Baião LA, Pérez JRO, Rezende CAP, et al. Desempenho de novilhos mestiços nelore suplementados em pastagem com diferentes níveis de concentrado no período seco do ano. Cienc Agrotec. 2005;29:1258-64.
13. Moraes EHBK, Paulino MF, Zervoudakis JT, Valadares Filho SC, Cabral LS, Detmann E, et al. Associação de diferentes fontes energéticas e protéicas em suplementos múltiplos na recria de novilhos mestiços sob pastejo no período da seca. Rev Bras Zootec. 2006;35:914-20.

14. Paulino MF, Detmann E, Valadares Filho SC, Lana RP. Soja grão e caroço de algodão em suplementos múltiplos para terminação de bovinos mestiços em pastejo. *Rev Bras Zootec.* 2002;31:484-91.
15. 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.
16. Minson DJ. Forage in ruminant nutrition. New York: Academic Press; 1990.
17. Garcia J, Alcalde CR, Zambom MA, Martins EM, Jobim CC, Andrade SRDF, et al. Desempenho de novilhos em crescimento em pastagem de *Brachiaria decumbens* suplementados com diferentes fontes energéticas no período da seca e transição seca-águas. *Rev Bras Zootec.* 2004;33:2140-50.
18. Alvim MJ, Vilela D, Lopes RS. Efeitos de dois níveis de concentrado sobre a produção de leite de vacas da raça Holandesa em pastagem de Coast-cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). *Rev Bras Zootec.* 1997;26:967-75.
19. Vilela D. Produção de leite em pasto: atualidades e perspectivas futuras. In: Anais do 2º Simpósio sobre Manejo Estratégico da Pastagem; 2004, Viçosa. Viçosa: UFV; 2004. p.419-63.
20. Oliveira II. Avaliação de volumosos na dieta de vacas leiteiras na época seca: consumo, digestibilidade, produção de leite e simulação do CNCPS [dissertação]. Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso; 2007.
21. Silva HA, Koehler HS, Moraes A, Guimarães VDA, Hack E, Carvalho PCF. Análise da viabilidade econômica da produção de leite a pasto e com suplementos na região dos Campos Gerais – Paraná. *Cienc Rural.* 2008;38:445-50.

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

**Aceito em: 04/09/12**

## GANHO DE PESO E MEDIDAS BIOMÉTRICAS DE CAPRINOS JOVENS EM FUNÇÃO DO GRUPO RACIAL, PESO DE ABATE E SEXO

Jakilane Jacque Leal de Menezes<sup>1</sup>  
Heraldo Cesar Gonçalves<sup>2</sup>  
Gil Ignácio Lara Cañizares<sup>1</sup>  
Luciana Rodrigues<sup>1</sup>  
Brenda Batista Lemos de Medeiros<sup>3</sup>  
Helen Fernanda Barros Gomes<sup>3</sup>  
Raquel Ornelas Marques<sup>3</sup>  
Melissa de Souza Emerson<sup>3</sup>

### RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito do grupo racial, peso de abate e sexo nas características de desempenho e medidas biométricas de caprinos jovens, provenientes de rebanhos leiteiros, como produtores de carne, em sistema intensivo de criação. Foram avaliados o peso ao nascimento, 28 e 60 dias, idades para que os animais atingissem 25, 30 e 35 kg e medidas biométricas de cabritos de cinco grupos raciais: Alpino,  $\frac{1}{2}$  Boer +  $\frac{1}{2}$  Alpino ( $\frac{1}{2}$  BA),  $\frac{1}{2}$  Anglo Nubiano +  $\frac{1}{2}$  Alpino ( $\frac{1}{2}$  ANA),  $\frac{3}{4}$  Boer +  $\frac{1}{4}$  Alpino ( $\frac{3}{4}$  BA),  $\frac{1}{4}$  Boer +  $\frac{1}{4}$  Alpino +  $\frac{1}{2}$  Anglo Nubiano (Tricross), com três pesos de abate/avaliação (25, 30 e 35 kg) e dois sexos em sistema de confinamento, com utilização de dieta completa. As características de medidas biométricas avaliadas foram escore, comprimento corporal, altura anterior e posterior, perímetro da perna e largura da garupa e do peito. A participação das raças Boer e Anglo Nubiano em cruzamentos com a raça Alpina melhorou o escore corporal e peso aos 28 e 60 dias. Os caprinos machos chegaram ao peso de abate aos 30 e 35 kg mais precocemente que as fêmeas. O grupo racial Alpino foi mais tardio para atingir os 25, 30 e 35 kg em relação aos mestiços Boer e Anglo Nubiano. Com o aumento do peso de abate houve aumento do escore corporal e das medidas biométricas.

**Palavras-chave:** biometria, cabrito, escore corporal, peso ao nascimento

### WEIGHT AVERAGE DAILY GAINS AND BIOMETRIC MEASURES IN KIDS AS AFFECTED BY GENOTYPE, SLAUGHTER WEIGHT AND SEX

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of genotype Alpine,  $\frac{1}{2}$  Boer +  $\frac{1}{2}$  Alpine ( $\frac{1}{2}$  BA),  $\frac{1}{2}$  Anglo Nubiano +  $\frac{1}{2}$  Alpine ( $\frac{1}{2}$  ANA),  $\frac{3}{4}$  Boer +  $\frac{1}{4}$  Alpine ( $\frac{3}{4}$  BA),  $\frac{1}{4}$  Boer +  $\frac{1}{4}$  Alpine +  $\frac{1}{2}$  Anglo Nubiano (Tricross), gender and slaughter weight (25, 30 and 35 kg) on the performance and biometric measures of kids from dairy goat herds reared on intensive feeding

<sup>1</sup> Doutorandos do Programa de Pós-graduação em Zootecnia. Departamento de Produção Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ FMVZ – UNESP, Botucatu-SP. Email: jakilane@yahoo.com.br; inabra68@hotmail.com; mazolu@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Professor do Departamento de Produção Animal e do Programa de Pós-graduação em Zootecnia. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ FMVZ – UNESP, Botucatu-SP. Email: [heraldo@fmvz.unesp.br](mailto:heraldo@fmvz.unesp.br).

**Correspondência:** Heraldo Cesar Gonçalves. Departamento de Produção Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ FMVZ - UNESP, Distrito de Rubião Junior, s/n, Botucatu/ SP, Caixa Postal 560, CEP 18618-000. (14) 3880-2951 / 3880-2961

<sup>3</sup> Mestrandos do Programa de Pós-graduação em Zootecnia. Departamento de Produção Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ FMVZ – UNESP, Botucatu-SP. Email: geozoo2002@yahoo.com.br; helenfbgomes@ig.com.br; ra\_ornelas@yahoo.com.br; melsouzaemerson@yahoo.com.br

systems. The evaluated traits were: weight at birth, 28 and 60 days old and age at 25, 30 and 35 kg. Biometrics measures: score, body length, previous and posterior height, leg perimeter, rump and chest width. Boer and Anglo Nubiano crossbred with Alpine improved corporal score and weight at 28 and 60 days old. Males reached slaughter weight at 30 and 35 kg more precociously than females. Crossbreed Boer and Anglo Nubiano reached earlier 25, 30 and 35 kg than Alpine. The greater was the slaughter weight the higher was corporal score and biometric measures.

**Keywords:** biometry, kid, body score, birth weight

## GANANCIA DE PESO Y MEDIDAS BIOMÉTRICAS DE CABRITOS EN RELACIÓN CON EL GENOTIPO, PESO AL SACRIFICIO Y SEXO

### RESUMEN

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del grupo racial, del peso al sacrificio y del sexo sobre las características de rendimiento y medidas biométricas de caprinos jóvenes provenientes de rebaños lecheros para ser utilizados como productores de carne en sistemas intensivos. Fueron evaluados el peso al nacimiento, a los 28 y a los 60 días, las edades en que los animales llegaron a los 25, 30 y 35 kg así como las medidas biométricas de cabritos de cinco grupos raciales: Alpina,  $\frac{1}{2}$  Boer +  $\frac{1}{2}$  Alpina ( $\frac{1}{2}$  BA),  $\frac{1}{2}$  Anglo Nubia +  $\frac{1}{2}$  Alpina ( $\frac{1}{2}$  ANA),  $\frac{3}{4}$  Boer +  $\frac{1}{4}$  Alpina ( $\frac{3}{4}$  BA),  $\frac{1}{4}$  Boer +  $\frac{1}{4}$  Alpina +  $\frac{1}{2}$  Anglo Nubia (Tricross), con tres pesos de sacrificio/evaluación (25, 30 y 35 kg) y dos sexos en sistema de confinamiento, con la utilización de dieta completa. Las características de medidas biométricas evaluadas fueron puntuación corporal, longitud del cuerpo, altura anterior y posterior, perímetro de la pierna y anchura de la grupa y pecho. La participación de las razas Boer y Anglo Nubia en cruza con la raza Alpina mejoró la puntuación corporal y peso a los 28 y 60 días. Los caprinos machos alcanzaron el peso de sacrificio de 30 y 35 kg más rápidamente que las hembras. El grupo racial Alpino demoró más tiempo para alcanzar los 25, 30 y 35 kg en relación a los mestizos de Boer y Anglo Nubia. Con el aumento del peso al sacrificio hubo aumento de la puntuación corporal y de las medidas biométricas.

**Palabras clave:** biometría, cabrito, puntuación corporal, peso al nacimiento

### INTRODUÇÃO

No Brasil, o rebanho efetivo caprino cresceu 3 milhões de cabeças em 30 anos, e a produção de carne caprina passou de 20 para 42 mil toneladas de 1977-2007 (1). Esses valores têm motivado os produtores na melhoria dos rebanhos, por meio de seleção e introdução de animais de raças especializadas na produção de carne.

Em São Paulo, os criadores de raças leiteiras têm utilizado suas matrizes, para cruzamento com reprodutores de raças especializadas na produção de carne, pressupondo conseguir complementaridade entre raças, obtendo animais mais precoces, com maior rendimento de carcaça e melhor qualidade de carne, capaz de suprir as necessidades do mercado consumidor.

Resultados iniciais tem demonstrado desempenho três a quatro vezes superior ao da região Nordeste, considerando o peso de abate entre 20 e 25 kg e idade de 90 a 120 dias, de cabritos Alpinos,  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{3}{4}$  Boer x Alpino, criados em confinamento (2). Embora considerado jovens, em relação à média nacional, o sistema não assegura às carcaças e a carne, qualidade suficiente para atender a demanda do mercado, principalmente em relação à cobertura de

gordura. Além disso, o rendimento da carcaça é outra preocupação, uma vez que têm sido relatados valores inferiores a 50% (3-5).

Animais da raça Boer têm sido utilizados nessas criações, pois foram afamados por apresentarem elevado ganho de peso diário (6) e, possuírem carcaças com altos rendimentos e mais compactas, em relação a outras raças caprinas (7).

Outras raças com potencial para produção de carne podem ser utilizadas nos cruzamentos, como é o caso da raça Anglo Nubiana, caracterizados por seu grande porte, rusticidade, e por apresentar pele e carne de boa qualidade (8).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do grupo racial, peso de abate e sexo nas características de desempenho e medidas biométricas de cabritos Alpinos,  $\frac{1}{2}$  BA,  $\frac{1}{2}$  ANA,  $\frac{3}{4}$  BA e Tricross, visando sua utilização como produtores de carne, em sistema intensivo de criação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na UNESP - FMVZ, Campus de Botucatu, na Área de Produção de Caprinos e foi aprovado pela comissão local de ética em experimentação animal.

Foram utilizados 74 cabritos de cinco grupos raciais, distribuídos em três pesos de abate e dois sexos (Tabela 1).

Os cabritos foram aleitados artificialmente com leite de cabra fervido, fornecido em duas refeições diárias até o 10º dia, e a partir do 11º dia, um aleitamento por dia de manhã. A quantidade de leite oferecido diariamente não ultrapassou 1,5 L, e o desmame foi realizado aos 60 dias. A partir da segunda semana, os cabritos tiveram concentrado farelado a disposição.

Os animais iniciaram o experimento com média de 28 dias, foram alojados em 10 baias coletivas, de acordo com o grupo racial (GR) e sexo (S), e passaram a receber dieta experimental, contendo 70% de concentrado e 30% de feno de *Coast cross*. A dieta foi formulada de acordo com exigências do NRC (9), para ganho de 150 g/dia, cuja análise foi feita no Laboratório de Bromatologia da FMVZ-UNESP de Botucatu, revelando os valores de 90,6; 21,3; 2,3; 5,4; 14,9; 56,0; 70,7; 45,9 e 22,0% para matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo, cinzas, fibra bruta, extrato não nitrogenado, nutrientes digestivos totais, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido, respectivamente.

O desempenho foi avaliado com base nas características: peso ao nascer (PN), peso aos 28 dias (P28), peso ao desmame realizado aos 60 dias (P60) e idades para atingir 25 (I25), 30 (I30) e 35 kg (I35) de peso vivo.

Um terço dos animais de cada GR foi abatido na semana em que, atingiram peso médio de 25, 30 e 35 kg, para avaliação da carcaça e qualidade da carne, sendo abatidos 27, 21 e 26 animais, respectivamente (Tabela 1). Portanto, para as características avaliadas nos pesos de 30 e 35 kg avaliaram-se 47 e 26 animais, respectivamente.

A avaliação da condição corporal e as medidas biométricas foram realizadas nos machos e, nas fêmeas na véspera do dia de abate. Para avaliação da condição corporal foi usada a designação *escore*, que é um método subjetivo, em que se utiliza uma escala de pontos de 0 a 5, em que 0 classifica o animal em estado de magreza extrema, e 5 o animal considerado gordo. A condição corporal foi avaliada mediante visualização e palpação da coluna vertebral, logo após o 13º par de costelas torácicas (10).

Foram tomadas seis medidas biométricas, de acordo com a metodologia utilizada por Yáñez (3): comprimento corporal (CC), altura anterior (AA), altura posterior (AP), perímetro da perna (PP), largura da garupa (LG) e largura do peito (LP).

Tabela 1. Distribuição dos animais experimentais de acordo com o grupo racial, peso de abate e sexo.

GR*	Peso de Abate						Total
	25 kg		30 kg		35 kg		
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	
Alpino	1	3	0	3	1	3	11
½ BA	2	3	1	3	1	3	13
½ ANA	1	2	2	1	2	2	10
¾ BA	4	5	2	4	3	5	23
TC	2	4	2	3	2	4	17
Totais	10	17	7	14	9	17	74

\*GR- Grupo racial: ½ BA- ½ Boer + Alpino, ½ ANA- ½ Anglo Nubiano + Alpino, ¾ BA- ¾ Boer + Alpino, TC: tricross – ½ Anglo Nubiano + ¼ Alpino + ¼ Boer.

Ao atingirem o peso pré- determinado para o abate, peso vivo na origem (PVO), os animais foram submetidos a jejum de 24 horas de sólidos, e em seguida pesados, para determinar o peso vivo ao abate (PVA), sendo abatidos em frigorífico comercial, obedecendo ao fluxo normal do estabelecimento.

O cálculo da conversão alimentar (CA/PVA) foi estimado pela relação entre o consumo total da dieta (CTD), durante todo o experimento, e a soma do peso vivo ao abate (PVA) dos animais de cada combinação, grupo racial e sexo. O custo da dieta foi baseado em pesquisa de preço dos ingredientes da dieta, na região de Botucatu e São Manuel, no estado de São Paulo, tendo sido estimado em R\$ 0,76/kg. O custo do quilograma do PVA foi calculado pela relação, entre custo total da dieta e PVA, computando-se ou não, o custo do leite fornecido.

As características de desempenho foram analisadas em esquema fatorial, com 5 grupos raciais x 2 sexos, no delineamento inteiramente casualizado (Modelo I), e o teste de Tukey (P<0,05) para a comparação entre médias.

#### MODELO I

$$Y_{ijk} = \mu + GR_i + S_j + GR * S_{ij} + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

$Y_{ijk}$  = característica observada no animal k, do sexo j e pertencente ao grupo racial i;

$\mu$  = constante inerente aos dados;

$GR_i$  = efeito do grupo racial i, sendo i = 1: A, 2: ½ BA, 3: ½ ANA, 4: ¾ BA e 5: TC;

$S_j$  = efeito do sexo j, sendo j = 1: macho e 2: fêmea;

$GR*S_{ij}$  = efeito da interação entre GR e S;

$e_{ijk}$  = erro associado à informação

$$Y_{ijk} \sim \text{NID}(0; \sigma_e^2).$$

As características de condição corporal e as medidas biométricas foram analisadas em esquema fatorial, com 5 grupos raciais (GR) x 3 pesos de abate/avaliação (PA) x 2 sexos (S), no delineamento inteiramente casualizado e teste de Tukey (P<0,05), para comparação entre médias. A interação GR\*PA\*Sexo não foi incluída no modelo de análise, em função da falta de observação e reduzido número de observação, em algumas combinações das fontes de variação.

Para execução das análises estatísticas foi utilizado o programa SAEG, versão 8.0 (11).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grupo racial (GR) e o sexo (S) influenciaram as características P60 e I25 e a interação GR\*S, as características P28, I30 e I35.

As médias de PN, aos P28 e P60 (Tabela 2) foram consideradas satisfatórias para caprinos, e sendo superior aos resultados encontrados por Ramos, Costa e Medeiros (12), que observaram PN e P28 de 2,8 e 5,8 kg, respectivamente na raça Alpina, e Oliveira (13), com caprinos das raças Anglo Nubiana e Boer, com médias de PN de 2,70 e 2,76 kg, para as respectivas raças. O PN é uma característica importante para estimar a probabilidade de sobrevivência dos animais pós-nascimento e o desempenho subsequente.

Tabela 2. Médias de características de desempenho em função do grupo racial e sexo.

Característica	Média	Grupo Racial#					Sexo		CV
		Alpino	½ BA	½ ANA	¾ BA	TC	Macho	Fêmea	
PN (kg)	3,32	3,31	3,56	2,95	3,27	3,51	3,44	3,20	17,23
P 60 dias (kg)	11,95	10,44c	13,05a	12,43ab	11,16bc	12,66 <sup>a</sup>	12,78a	11,12b	11,66
I 25 kg (Dias)	145	177,44a	133,37b	141,60b	146,26b	128,50b	132,64b	158,23a	13,69
Interação GR * Sexo									
	Média	Sexo	Grupo Racial						
			Alpino	½ BA	½ ANA	¾ BA	TC		
P 28 dias (kg)	6,17	Macho	4,85Ba	6,60Aa	6,74Aa	6,53Aa	6,72Aa	13,66	
		Fêmea	6,24Aa	6,73Aa	5,60Bab	5,15Bb	6,46Aa		
I 30 kg(dias)	168	Macho	228Aa	135Bb	136Bb	144Bb	135Bb	9,14	
		Fêmea	206Aa	165Ab	191Aab	176Ab	169Ab		
I 35 kg (dias)	193	Macho	263Aa	154Bbc	142Bc	162Bbc	180Ab	5,96	
		Fêmea	232Ba	187Ac	220Aab	198Abc	191Abc		

Para PN, P60 e I25, médias seguidas de mesma letra não diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey, para GR e sexo. Para P28, I30 e I35, médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem para sexo e grupo racial ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey, respectivamente.

#½ BA- ½ Boer x ½ Alpino, ½ ANA- ½ Anglo Nubiano x ½ Alpino, ¾ BA- ¾ Boer x ¼ Alpino, TC- Tricross.

O esquema de aleitamento até os 60 dias de idade proporcionou bom desenvolvimento aos animais, que atingiram peso médio equivalente a aproximadamente quatro vezes superior ao peso de nascimento. Esse resultado foi semelhante ao obtido por Menezes et al. (2), em estudo com mestiços Boer (½ e ¾ BA) e Alpino, onde aos 60 dias os animais atingiram peso equivalente a 3,97 vezes superior ao peso de nascimento. Esse desempenho pode ser em parte atribuído ao consumo de alimentos sólidos, que contribuiu para promover o desenvolvimento das papilas ruminais, melhorando o desempenho dos animais.

Não foi observada diferença entre os grupos raciais para a característica de PN, semelhante aos resultados obtidos por Menezes et al. (2), que trabalharam com os grupos raciais Alpino ½ e ¾ BA, e Oliveira (13), com mestiços Anglo Nubiano e Boer, porém discordam dos resultados obtidos por Dhanda et al. (14), que encontraram diferença entre os grupos raciais, sendo a maior média observada para os mestiços Boer em relação aos demais cruzamentos.

O P60 foi influenciado pelo GR e S. Os maiores P60 foram obtidos pelos animais dos grupos ½ BA, ½ ANA e Tricross. Com exceção dos ¾ BA, todos os grupos raciais apresentaram pesos maiores que os Alpinos aos 60 dias. Estes resultados indicam uma

redução na capacidade dos Alpinos e  $\frac{3}{4}$  Boer, de ganhar peso nessa fase em relação aos outros mestiços.

Esses resultados são contrários ao constatado por Menezes (4), que não observou diferença entre grupos raciais para P60, indicando que, dependendo dos grupos raciais envolvidos, essas diferenças podem ou não ocorrer, em função das diferentes retenções de heterose dos cruzamentos.

Os caprinos machos apresentaram maior P60, não apresentando diferença entre S no PN e aos P28. Esse resultado foi semelhante ao de Menezes (4), que aos 60 dias observou que os machos foram mais pesados e diferem dos apresentados por Silva e Araújo (15), em estudo com mestiços Alpino x Moxotó e Anglo Nubiano x Alpino x Moxotó, que não observaram diferença entre sexo.

Os cabritos atingiram os pesos de 25, 30 e 35 kg, com média de 145, 168 e 193 dias de idade, respectivamente. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Goonewardene et al. (16) em mestiços Boer x Alpino, que atingiram 27,15 kg aos 160 dias.

O GR influenciou a idade em que os cabritos atingiram 25 kg. Os Alpinos apresentaram média superior a todos os grupos raciais avaliados, que não diferiram entre si, portanto, levaram mais dias para atingir os 25 kg, sendo dessa forma mais tardios quando comparados aos demais grupos raciais, implicando em elevação dos custos de produção.

Neste trabalho, a dieta utilizada foi formulada para permitir o máximo potencial de desenvolvimento dos diferentes grupos raciais utilizados, mas apesar disso, os mestiços Boer mesmo tendo grande potencial de ganho de peso, não apresentaram diferença em relação aos outros grupos raciais.

Com relação ao sexo, os caprinos machos atingiram o peso de abate de 25 kg mais rapidamente que as fêmeas.

No P28 houve interação entre GR\*S (Tabela 2). Diferença entre S foi observada nos  $\frac{1}{2}$  ANA e  $\frac{3}{4}$  BA, em que os machos apresentaram maior P28 em relação às fêmeas, e no grupo Alpino os machos apresentaram peso inferior às fêmeas. Para a raça Alpina essa diferença persistiu com o passar do tempo, com as fêmeas apresentando maior rapidez de ganho de peso e atingindo o peso de 35 kg, mais rapidamente que os machos. Esse resultado pode ter ocorrido em função da amostragem reduzida de machos.

Não houve diferença entre grupos raciais para os machos. Entre as fêmeas foi observado menor P28 para o GR  $\frac{3}{4}$  BA em relação às Alpinas,  $\frac{1}{2}$  BA e Tricross, sendo que as  $\frac{1}{2}$  ANA não diferiu dos demais grupos.

Na interação GR\*S para idade aos 30 kg (Tabela 2), os machos dos grupos raciais  $\frac{1}{2}$  BA,  $\frac{1}{2}$  ANA,  $\frac{3}{4}$  BA e Tricross foram mais precoces que as fêmeas. Para o grupo Alpino não houve diferença entre sexo.

As fêmeas do GR Alpino foram semelhantes as  $\frac{1}{2}$  ANA e mais tardias que dos outros grupos raciais para idade aos 30 kg. As cabritas  $\frac{1}{2}$  ANA não diferiram dos demais grupos raciais. Para os machos, com exceção dos Alpinos, prejudicados pela amostragem, não foi observada diferença entre eles.

Na interação GR\*S para idade aos 35 kg (Tabela 2), os machos Alpinos foram mais tardios em relação aos demais grupos raciais. Os machos  $\frac{1}{2}$  ANA foram mais precoces que os Tricross para atingirem 35 kg, com médias semelhantes aos  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{3}{4}$  BA, e não diferiram dos Tricross. As fêmeas  $\frac{1}{2}$  BA foram mais precoces que as Alpinas e  $\frac{1}{2}$  ANA, e não diferiram das  $\frac{3}{4}$  BA e Tricross, que por sua vez, foram semelhantes as  $\frac{1}{2}$  ANA.

Não houve diferença entre S para o GR Tricross. Os machos  $\frac{1}{2}$  ANA,  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{3}{4}$  BA foram mais precoces que as fêmeas, e no GR Alpino as fêmeas foram mais precoces.

O desempenho do GR Alpino foi inferior aos demais grupos raciais, mesmo quando não ocorreu interação entre S na idade para atingir 25 kg, e na interação com S, nas idades para atingir 30 e 35 kg. Provavelmente, no caso dos machos devem-se a pequena amostragem. No caso das fêmeas, mesmo com o número semelhante ao dos outros grupos raciais, observou-se

o mesmo comportamento inferior, denotando capacidade inferior de crescimento nas condições do experimento.

O peso ao abate (PA) e grupo racial (GR) influenciaram as características EC, CC, AA. O PA ainda influenciou a AP, PP e LP, e o S a LG e LP. A AP também foi influenciada pela interação PA\*S. As médias dessas características são apontadas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Médias de escore corporal e medidas biométricas de caprinos jovens em função do grupo racial, sexo e peso de abate.

Característica	Média	Grupo Racial#					TC	CV (%)
		Alpino	½ BA	½ ANA	¾ BA			
EC (0-5)	3,00	2,57c	3,02b	3,08ab	3,36a	2,99b	9,24	
CC (cm)	69,02	69,54ab	68,78ab	69,79ab	66,67b	70,35a	4,92	
AA (cm)	63,49	65,02ab	62,15bc	65,17ab	59,66c	65,46a	7,03	
AP (cm)	64,60	66,39a	62,44b	66,12a	61,23b	66,80a	4,63	
PP (cm)	37,58	36,64	36,63	38,27	37,78	38,57	7,73	
LG (cm)	20,01	18,05	21,80	18,89	21,37	19,93	18,42	
LP (cm)	20,74	18,95	22,48	19,18	22,05	21,04	16,51	
	Média	Peso de Abate (kg)			Sexo			
		25	30	35	Macho	Fêmea		
EC (0-5)	3,00	2,86b	2,96b	3,18a	3,06	2,95		
CC (cm)	69,02	64,95c	69,73b	72,40a	68,09	69,96		
AA (cm)	63,49	60,59c	63,98b	65,90a	63,58	63,40		
PP (cm)	37,58	35,42b	37,27b	40,05a	37,51	37,64		
LG (cm)	20,01	18,93	19,83	21,27	17,58b	22,44a		
LP (cm)	20,74	19,31b	20,61ab	22,30a	19,30b	22,18 <sup>a</sup>		

Para cada fonte de variação, médias seguidas de mesma letra não diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

EC- Escore corporal, CC- Comprimento corporal, AA- Altura anterior, AP- Altura posterior, PP- Perímetro da perna, LG- Largura da garupa, LP- Largura do peito. #½ BA- ½ Boer + ½ Alpino, ½ ANA- ½ Anglo Nubiano + ½ Alpino, ¾ BA- ¾ Boer + ¼ Alpino, TC-Tricross.

Todos os mestiços apresentaram melhor escore corporal (EC) que os Alpinos. Os ¾ BA foram superiores aos ½ BA e TC e aquele como estes não diferiram dos ½ ANA, mostrando que a participação da raça Boer em cruzamento com Alpino aumentou linearmente seu EC. Esses resultados concordam com Menezes et al. (2) que constataram que mestiços Boer apresentaram as maiores médias de EC em relação aos Alpinos. O melhor EC dos mestiços Boer possivelmente se deve a seleção a que foram submetidos para a produção de carne e pode representar vantagem para o produtor, principalmente se os cabritos forem comercializados vivos, como é rotina em alguns criatórios.

A média de CC de 69,02cm foi semelhante aos valores referenciados na raça Saanen por Yáñez et al. (17), e na avaliação de cabritos Alpinos e mestiços (½ e ¾ Boer) (2).

Nenhum dos cruzamentos realizados contribuiu para aumentar ou diminuir o CC dos Alpinos, porém os Tricross apresentaram maior comprimento que os ¾ BA. Esse resultado era esperado, pois as raças Alpina e Anglo Nubiana são mais compridas, característica de animais de biótipo funcional leiteiro, enquanto que a raça Boer é constituída por animais compactos, por serem selecionados para produção de carne.

À medida que aumentou a participação da raça Boer nos cruzamentos, observou-se redução das AA e AP dos Alpinos, porém, os mestiços de Anglo Nubiano mantiveram a mesma altura dos Alpinos, mas foram superiores aos ¾ BA. Esses resultados podem ser atribuídos à seleção para produção de leite das raças Alpina e Anglo Nubiana, que privilegia animais com biótipo longilíneo.

Todas as medidas biométricas foram influenciadas pelo peso de avaliação, com exceção da LG, e como era o esperado, à medida que, o peso aumentou, todas as características apresentaram aumento (Tabela 3).

O CC e AA aumentaram linearmente com o aumento do peso de avaliação. O EC e PP foram maiores aos 35 kg do que aos 25 e 30 kg, não diferindo entre si. A LP foi maior aos 35 do que aos 25 kg e estes não apresentaram diferença aos 30 kg (Tabela 3).

As fêmeas apresentaram LG e LP maiores que os machos. Isso pode ter ocorrido em função da maior deposição de gordura subcutânea nas regiões dianteira e traseira do corpo das fêmeas. Esse resultado discorda dos obtidos por Menezes (4), em caprinos de três grupos raciais e abatidos com 60, 90 e 120 dias, onde os machos apresentaram maior LP e LG.

Não houve diferença entre S para AP aos 25 e 35 kg, mas aos 30 kg as fêmeas apresentaram maior AP (Tabela 4).

Tanto os cabritos machos quanto fêmeas apresentaram aumento da AP com o aumento do PA. Os machos tiveram médias semelhantes aos 25 e 30 kg, diferindo dos abatidos com 35 kg.

As fêmeas apresentaram AP semelhante nos pesos de abate de 30 e 35 kg, diferindo dos animais abatidos com 25 kg.

Tabela 4. Médias de altura posterior em função do peso de abate e sexo.

Característica	Média	Sexo	Peso de Abate		
			25 kg	30 kg	35 kg
Altura Posterior	64,60	Macho	62,55Ab	63,36Bb	67,52Aa
		Fêmea	60,71Ab	66,48Aa	66,96Aa

Para cada característica, médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem para sexo e peso de abate e sexo ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey, respectivamente.

A conversão alimentar da dieta (CA/PVA) para todos os grupos raciais foi de 3,97 kg/kg de PVA, sendo que as fêmeas de todos os grupos raciais apresentaram maiores valores, que os machos. A média do custo/PVA foi de R\$ 5,11, caso não seja computado o leite fornecido, ao preço de R\$ 0,60, o custo de produção do quilograma do PVA cai para R\$ 3,03. O leite representou 40,70% do custo total da alimentação. O menor custo de produção foi observado para o grupo tricross macho, em função de sua menor CA/PVA (Tabela 5).

Tabela 5. Custo de produção da alimentação por quilograma de peso vivo de cabritos em função do grupo racial e sexo.

Grupo Racial	Sexo	N	CTD (kg)	PVA (kg)	CA/PVA (kg/kg)	Custo Leite (R\$) <sup>1</sup>	Custo Ração (R\$)	Custo Total (R\$)	Custo/PVA (R\$/kg)	Custo/PVA (R\$/kg) <sup>2</sup>
Alpino	M	2	213	61,0	3,48	126	162	228	4,73	2,66
Alpino	F	9	1.264	261,6	4,83	567	966	1.533	5,86	3,69
½ BA	M	4	386	115,7	3,34	252	295	547	4,73	2,55
½ BA	F	9	1.139	274,0	4,16	567	870	1.437	5,24	3,17
½ ANA	M	5	531	157,0	3,38	315	406	721	4,59	2,58
½ ANA	F	5	521	151,1	3,45	315	398	713	4,71	2,63
¾ BA	M	9	962	274,3	3,50	567	735	1.302	4,74	2,68
¾ BA	F	14	1.795	427,2	4,20	882	1.302	2.254	5,27	3,21
TC	M	6	603	187,8	3,21	378	461	839	4,46	2,45
TC	F	11	1.345	333,1	4,04	693	1.721	1.721	5,17	3,08
Total	M F	74	8.904	2.243	3,97	4.662	6.802	11.721	5,11	3,03

N: número de animais; CTD: consumo total da dieta; PVA: peso vivo ao abate; CA/PVA: conversão alimentar por PVA; <sup>1</sup>: custo do leite R\$ 0,60; <sup>2</sup>: custo por quilograma de PVA, sem computar o leite.

Como a alimentação representa cerca de 60 a 70% dos custos de produção, o custo estimado do quilograma de PVA dos cabritos estaria entre R\$ 7,30 a 8,51 e R\$ 4,30 a 5,05,

computando ou não o preço do leite fornecido, respectivamente. Mesmo sem computar o custo do leite fornecido, o quilograma do PVA ainda é elevado nesse sistema de produção, se comparado ao valor da carne bovina ofertada no mercado, que está por volta de R\$ 2,50 o quilograma de peso vivo (18). Dessa forma para tornar a carne caprina competitiva, há necessidade de procurar alternativas para sistemas de produção que reduzam o custo da alimentação, prioritariamente os sistemas com uso de pasto.

## CONCLUSÕES

A participação das raças Boer e Anglo Nubiano em cruzamento com a raça Alpina melhorou o escore corporal e o peso aos 28 e 60 dias.

O grupo racial Alpino, nas condições do experimento, foi mais tardio para atingir os pesos de abate, embora no caso dos machos, a análise ficou prejudicada em função de poucas observações.

Existe sensível melhora na condição corporal no peso de abate de 35 kg e na primeira geração de cruzamento com Alpino, independente da raça utilizada.

A segunda geração de cruzamento com Boer proporcionou uma redução nas medidas biométricas em relação aos Alpinos, tornando os animais mais compactos.

As fêmeas apresentaram desempenho inferior aos machos para atingir os pesos de abate avaliados.

O custo de produção por quilograma de peso vivo é elevado, faz-se necessário a busca por sistemas de produção, que reduzam o custo da alimentação, com a utilização de pastagem.

## REFERÊNCIAS

1. Food and Agriculture Organization - FAO. Faostat database results [Internet]. Roma; 2007 [cited 2009 Mar 23]. Available from: <http://apps.fao.org/faostat/servlet/>.
2. Menezes JLL, Gonçalves HC, Ribeiro MS, Rodrigues L, Cañizares GIL, Medeiros BBL, et al. Desempenho e medidas biométricas de caprinos de diferentes grupos raciais. *Rev Bras Zootec.* 2007;36:635-42.
3. Yáñez EA. Desenvolvimento relativo dos tecidos e características de carcaça de cabritos Saanen, com diferentes pesos e níveis nutricionais [tese]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2002.
4. Menezes JLL. Desempenho e características de carcaça de caprinos de diferentes grupos raciais e idade ao abate [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2005.
5. Rodrigues L. Somatotropina bovina recombinante (rbST) e grupo racial sobre o desempenho, características de carcaça e qualidade da carne de caprinos em crescimento [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2006.
6. Van Niekerk WA, Casey NH. The Boer goat. II: Growth, nutrient requirements, carcass and meat quality. *Small Rumin Res.* 1988;1:355-68.
7. Skinner JD. Utilization of the Boer goat for intensive animal production. *Trop Anim Health Prod.* 1972;4:120-8.

8. Ribeiro SDA. Caprinocultura: criação racional de caprinos. São Paulo: Nobel; 1997.
9. National Research Council - NRC. Nutrient requirements of goats. Washington: National Academy of Sciences; 1981.
10. Morand-Fehr P, Hervieu J. Notation de létat corpora: a vos stylos. Chevre. 1989;175:39-42.
11. Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análise estatística e genéticas - manual do usuário. versão 8.0. Viçosa: UFV; 2000.
12. Ramos JLF, Costa RG, Medeiros AN. Desempenho produtivo de cabritos submetidos a diferentes períodos de aleitamento. Rev Bras Zootec. 2004;33:684-90.
13. Oliveira AN. Desempenho e características de carcaça de caprinos mestiços anglo nubiano, boer e caprinos sem padrão racial definido em pastagem e em confinamento [tese]. Fortaleza: Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará; 2006.
14. Dhanda JS, Taylor DG, McCosker JE, Murray J. The influence of goat genotype on the production of capretto and chevon carcass. 1- Growth and carcass characteristics. Meat Sci. 1999;52:355-61.
15. Silva FLR, Araújo AM. Desempenho produtivo em caprinos mestiços no semi-árido do Nordeste do Brasil. Rev Bras Zootec. 2000;29:1028-35.
16. Goonewardene LA, Day PA, Patrick N, Scheer HD, Patrick D, Suleiman A. A preliminary evaluation of growth and carcass traits in alpine and boer crosses. J Anim Sci. 1998;78:229-32.
17. Yáñez EA, Resende KT, Ferreira ACD, Pereira Filho JM, Silva Sobrinho AG, Teixeira IAMA, et al. Restrição alimentar em caprinos: rendimento, cortes comerciais e composição da carcaça. Rev Bras Zootec. 2006;35:2093-100.
18. Agrolink. Cotações [Internet]. 2009 [acesso em 2009 Abr 17]. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/cotacoes/cotacoes.aspx>.

**Recebido em: 12/04/11**

**Aceito em: 05/09/12**

## CARACTERÍSTICAS DOS ADOTANTES DE CÃES NA ÁREA URBANA DE BOTUCATU

Igor Adolfo Dexheimer Paploski<sup>1</sup>  
Selene Daniela Babboni<sup>2</sup>  
Gabriella Koppány González<sup>3</sup>  
Rosângela Maria Giarola<sup>4</sup>  
Sérgio Augusto Rodrigues<sup>5</sup>  
Ana Teresa de Abreu Ramos Cerqueira<sup>6</sup>  
Carlos Roberto Padovani<sup>7</sup>  
Cassiano Victória<sup>8</sup>  
José Rafael Modolo<sup>9</sup>

### RESUMO

A superpopulação de animais domésticos como o cão e o gato tem causado problemas à sociedade moderna como o aumento do número de agravos e a transmissão de doenças zoonóticas. Existe a necessidade de se recolher animais que possuam essas características em benefício à saúde pública. Uma vez recolhidos, são avaliados para que eventualmente possam ser doados. Este estudo teve como objetivo avaliar as características psicossociais de pessoas que buscam a adoção de cães seja no canil unicipal de Botucatu, seja na feira de doações de animais da cidade realizada por uma organização não governamental. Um questionário envolvendo variáveis psicossociais, econômicas e de avaliação do animal escolhido foi aplicado em todos os adotantes de cães do município por um período de dois meses. Foram registradas 29 adoções de cães no referido período, sendo que os adotantes têm idade média de 39 ( $\pm 14,4$ ) anos, residem com um companheiro(a) e possuem filhos.

**Palavras-chave:** perfil adotantes, perfil socioeconômico, cães.

### CHARACTERISTICS OF DOG ADOPTERS IN THE URBAN AREA OF BOTUCATU

#### ABSTRACT

The superpopulation of domestic animals like dogs and cats are causing problems to the society, such as an increase in the number of bites, accidents and the transmission of zoonotic diseases. To the best interest of Public Health, it is necessary to remove those animals from

<sup>1</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brasil

<sup>2</sup> Médica Veterinária Responsável pelo Canil Municipal da Prefeitura Municipal de Botucatu, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup> Médica Veterinária Coordenadora da Equipe de Vigilância Ambiental em Saúde da Prefeitura Municipal de Botucatu, São Paulo, Brasil

<sup>4</sup> Assistente de Suporte Acadêmico 4, Departamento de Saúde Pública, Faculdade de Medicina, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil

<sup>5</sup> Pós-graduando, Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil

<sup>6</sup> Professora Assistente Doutora, Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil

<sup>7</sup> Professor Titular, Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>8</sup> Professor Assistente Doutor, Área de Planejamento de Saúde Animal e Saúde Pública, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>9</sup> Professor Titular; Orientador da Residência na Área de Planejamento de Saúde Animal e Saúde Pública, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil.

the streets. Once removed, the animals are evaluated regarding the risks they may represent and, eventually, are donated again. The objective of this study was to evaluate the psychosocial characteristics that dog adopters have, whether the adoption is made in a public kennel or in a donation fair. A questionnaire aiming at the psychological, economical and at the animal characteristics was applied in all Botucatu dog adopters for two months. A total of 29 adoptions were registered in the referred period. The adopters mean age was 39 ( $\pm 14,4$ ) years, and they live with a partner and have children.

**Keywords:** adopters' profile, socioeconomic profile, dogs.

## CARACTERÍSTICAS DE LAS PERSONAS QUE ADOPTAN PERROS EN LA REGIÓN URBANA DE BOTUCATU

### RESUMEN

La sobrepoblación de animales domésticos como el perro y el gato ha causado problemas a la sociedad moderna tales como el aumento del número de accidentes por mordidas y la transmisión de enfermedades zoonóticas. Existe la necesidad de capturar estos animales en beneficio de la salud pública y una vez presos, estos son evaluados para su eventual donación. Este estudio tuvo como objetivo evaluar las características psicosociales de las personas con intención de adoptar perros, tanto del refugio municipal de Botucatu, como aquellos ofrecidos en ferias de adopción de una ciudad vecina y coordinadas por una organización no gubernamental. Fue aplicado un cuestionario que incluía variables psicosociales, económicas y de evaluación del animal elegido entre todos los adoptantes de perros del municipio por un período de dos meses. Así, fueron registradas 29 adopciones de perros durante este intervalo. Se logró identificar que los adoptantes tienen en promedio 39 ( $\pm 14,4$ ) años, viven con un compañero (a) y tienen hijos.

**Palabras clave:** perfil de adoptantes, perfil socio económico, perros.

### INTRODUÇÃO

A posse de animais de estimação é um ato saudável e pode ajudar no desenvolvimento afetivo e psicológico das pessoas, além de aumentar a produção de endorfina no organismo, ajudando a minimizar os efeitos da depressão e diminuir a percepção da dor e da ansiedade (1). Entretanto, a falta de posse responsável por parte de alguns proprietários de animais favoreceu o surgimento de problemas como a superpopulação de cães e gatos, o aumento do número de agravos provocados por eles, bem como acidentes de trânsito (2, 3), mordeduras (4-6) e transmissão de doenças (7, 8). Estes fatores tornam este contingente animal um problema para a saúde pública (9).

O Município de Botucatu, localizado no interior do Estado de São Paulo, possui 127.370 habitantes (10) com uma população de cães estimada de 29.197 (11). A cidade conta com um canil municipal sob a responsabilidade da Secretaria de Saúde, cujas atividades incluem o recolhimento de animais que possam causar riscos à saúde humana, seja por agressões, acidentes ou transmissão de doenças.

Fatores que facilitaram a doação de gatos em um abrigo já foram estudados, sendo mais facilmente adotados os gatos que ficam em gaiolas que tenham brinquedos no interior, não importando se os animais brincam com os objetos, e animais cujas gaiolas de exposição ficam na altura dos olhos dos adotantes (12). Nos Estados Unidos, cães de raças Terrier, caçadores, miniatura que possuam pelagens das cores amarelada, acinzentada ou branca, que sejam de

porte pequeno e tenham histórico de terem vivido em ambientes internos foram adotados mais facilmente (13).

A devolução de cães adotados e o porquê de determinadas adoções de cães não resultarem em sucesso também já foram estudadas. Os motivos para o insucesso da adoção variam de problemas difíceis de serem detectados antes de se concluir a adoção, destacando-se como exemplo o animal adotado não se acostumar com crianças ou outros animais da residência ou ainda o proprietário descobrir após a adoção, que é alérgico ao animal. Além disso, verificam-se problemas que evidenciam falta de preparo por parte do adotante, incompatibilidade com o tamanho que o animal assume ao final do seu crescimento, falta de tempo para ficar com o animal ou falta de espaço para o animal se exercitar (14, 15).

Entretanto, não foram encontrados dados na literatura consultada que determinem os fatores psicológicos e socioeconômicos que fazem um indivíduo adotar um animal. Com base nestas informações, foi proposto o presente projeto com os seguintes objetivos:

1. Avaliar as características psicossociais dos adotantes de cães da área urbana de Botucatu, SP, Brasil;
2. Avaliar diferentes motivações para as adoções de acordo com o local onde a pesquisa se realizou;
3. Identificar raças e características de cães que são mais frequentemente procuradas em uma adoção.

## MATERIAL E MÉTODOS

Um questionário padronizado com questões econômicas (renda, estrato social, etc.), psicossociais (se o adotante havia se preparado para a adoção, a quantidade de atividades de lazer que o indivíduo executa, etc.) e de características do animal adotado (sexo, tamanho, idade, etc.) foi aplicado a todos adotantes de cães no Município de Botucatu no período de julho a agosto de 2010. Características psicossociais foram entendidas neste trabalho como sendo processos que são sociais e psicológicos na sua origem. A inclusão de todos os participantes se fez após consentimento livre e esclarecido.

As perguntas do questionário foram elaboradas utilizando-se, além dos critérios já mencionados, a estratificação social segundo o Critério de Classificação Econômica Brasil da Associação Nacional de Empresas de Pesquisa (16) e a quantidade de atividades de lazer que o responsável pela adoção executa (ida à igreja, prática de esportes e hobbies, visita a familiares e amigos, entre outros) a partir de um questionário previamente descrito (17).

O questionário aplicado nas entrevistas foi validado em um pré-teste tendo sido feitas adequações de linguagem. Com base neste questionário, os adotantes foram classificados em grupos usando como linhas de cortes os quartis inferior e superior em relação ao número de atividades de lazer que o indivíduo relatou executar. Formaram-se assim os grupos que foram denominados de “pouco lazer”, “lazer razoável ou médio” e “muito lazer”.

Os adotantes de cães foram entrevistados no momento em que eles efetuavam a adoção seja no canil municipal, durante os dias de semana, seja em uma feira de doação de animais que acontece aos sábados, no centro da cidade. A adoção dos animais não foi condicionada à aplicação do questionário.

As informações obtidas foram armazenadas em um banco de dados (planilha EXCEL) e posteriormente submetidas à estatística descritiva envolvendo a construção das distribuições de frequências e respectivos gráficos, complementada com o teste de associação de Goodman (18, 19). Todas as conclusões estatísticas foram realizadas no nível de 5% de significância.

## RESULTADOS

Foram entrevistados 29 adotantes, 55% (16/29) dos quais eram do sexo feminino. A idade média dos adotantes foi de 39 anos ( $\pm 14,4$ ), variando de 17 a 65 anos de idade. Um total de 79,3% (23/29) dos adotantes residia com companheiro e 89,6% (26/29) possuía filhos. A presença de outro animal no domicílio foi relatada por 58,6% (17/29) dos adotantes, 70,5% (12/17) destes possuíam apenas cães, 11,7% (2/17) pássaros, 5,8% (1/17) gatos e 11,7% (2/17) cães e gatos. 27,5% dos entrevistados (8/29) já havia adotado cães em situações prévias. Destes, 25% (2/8) relataram buscar nova adoção em razão de a experiência anterior ter sido agradável. As demais motivações para buscar uma nova adoção foram variadas: motivações afetivas (“*não consigo ficar sem cães*”), promessas (“*prometi que teria mais um cachorro*”) desejo de ter um animal do sexo oposto ao do animal que já possui. Os adotantes residiam predominantemente em casas na área urbana (96,5%), enquanto 3,4% (1/29) residiam em casa na área rural. Ninguém relatou morar em apartamento.

Em relação ao adotante ser o dono ou responsável pelo animal adotado 75,8% (22/29) relataram que seriam eles mesmos os donos, 10,3% (3/29) relataram que os donos dos cães seria um dos filhos; 6,9% (2/29) relataram que o dono seria o cônjuge e 6,9% (2/29) relataram que o dono seria um neto.

Quanto à estratificação social do público alvo, constatou-se que não havia entre os entrevistados pessoas das classes A1, A2 e E. Verificou-se que 13,7% (4/29) dos entrevistados eram da classe B1 com renda familiar mensal em dólares (cotação de agosto de 2010, 1 Dólar = 1,75 Reais) estimada em U\$1.602,00; 34,4% (10/29) eram da classe B2 com renda de U\$954,00; 48,2% (14/29) eram da classe C com renda de U\$530,00; e 3,4% (1/29) eram da classe D com renda de U\$242,00.

Tabela 1. Número de entrevistados que se prepararam para a adoção de cães de acordo com o local de adoção.

Preparação	Local		Total
	Canil	Feira	
Sim	11 <sup>Aa*</sup>	8 <sup>Aa</sup>	19
Não	4 <sup>Aa</sup>	6 <sup>Aa</sup>	10
<b>Total</b>	15	14	29

\*Letras iguais indicam que não existem diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ), considerando letras minúsculas para comparação nas linhas e maiúsculas nas colunas.

Não houve diferença entre a adoção ter sido realizada no canil ou na feira de adoção (Tabela 1).

Quando perguntado se haviam se preparado para a adoção, 34,5% (10/29) dos entrevistados disseram não haver nenhum planejamento anterior à adoção. A forma mais comum de se preparar para a adoção do animal foi comprar ou construir uma casinha, seguida da aquisição de ração. Outras formas de preparo prévio para a adoção também foram relatadas, como pensar em um veterinário para atender o animal ou comprar brinquedos. Fatores como o nível de lazer do entrevistado não influenciaram no fato de ele se preparar ou não para a adoção.

Embora o presente estudo não tenha detectado associação estatística entre o local de adoção ( $p < 0,05$ ) e o fato de ter se preparado ou não para tal (Tabela 1), verificou-se uma proporção maior de pessoas que se prepararam entre os que procuram o canil municipal.

Um total de 58,6% dos adotantes não tinham pensado em algum nome, uma forma de “vínculo antecipatório”, para o animal a ser adotado. Não foi detectada relação entre pensar em um nome com tomar atitudes concretas de se preparar para a chegada do animal previamente à adoção.

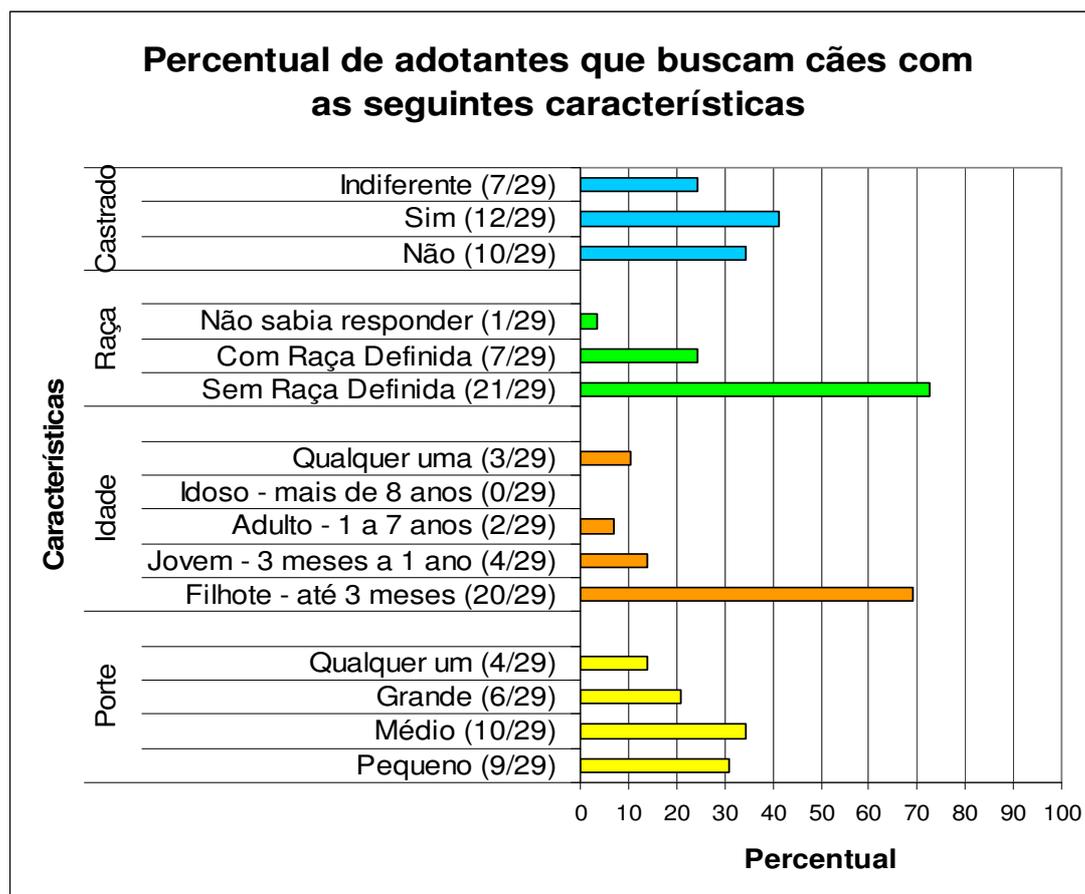


Figura 1. Proporção de adotantes de cães segundo características destes. Entre parênteses, valores absolutos da característica em questão.

A maioria dos adotantes buscava cães sem raça definida (65,5%), com idade menor que 3 meses (68,9%) e 65,5% deles buscavam ou não rejeitavam cães castrados (Figura 1). Dentre os adotantes que buscavam animais de raça, as citadas foram Pastor Alemão, Poodle, Basset, Labrador, Rottweiler e Pit-Bull, sendo esta última citada por dois adotantes. Quanto à idade mais procurada, 68,9% buscavam filhotes, classificados como animais com menos de três meses de idade. Observou-se que não houve procura para a adoção de animais idosos (com mais de oito anos). Já em relação ao porte, é interessante notar que esta característica não parece ser decisiva no momento da adoção.

Tabela 2. Número de adotantes segundo local e nível de lazer.

Nível de Lazer	Local		TOTAL
	Canil	Feira	
Pouco	6 <sup>Aa*</sup>	2 <sup>Aa</sup>	8
Razoável	8 <sup>Aa</sup>	3 <sup>Aa</sup>	11
Muito	1 <sup>Ba</sup>	9 <sup>Bb</sup>	10
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>29</b>

\*Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ), considerando letras minúsculas para comparação nas linhas e maiúsculas nas colunas.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os adotantes com maior atividade de lazer e os demais (Tabela 2), bem como entre os locais procurados para adoção dentre os

entrevistados com “muito lazer”, revelando que o nível de lazer mais alto se dá em adoção na feira de doações. Fatores como renda ou estrato social do adotante não influíram no nível de lazer.

## DISCUSSÃO

O fato de 79,3% dos adotantes residir com um companheiro e de 89,6% possuírem filhos sugere que o maior número de adoções foi realizado por famílias e não por pessoas solitárias diferindo da idéia de que pessoas solitárias e sem filhos buscam adoções de animais mais frequentemente do que as que moram com alguém e tem filhos. Isso é de particular interesse no planejamento de estratégias de divulgação de doações de animais, em que imagens e textos voltados para a participação do animal dentro do ciclo familiar podem ser utilizados para um maior número de pessoas se identificarem com a situação e buscarem a adoção.

Quase a totalidade dos adotantes (96,5%) residiam em área urbana e nenhum morava em apartamento. Em razão de Botucatu ser uma cidade do interior do Estado de São Paulo e de não possuir muitos prédios residenciais verticais, nosso achado de que nenhum morador de apartamento buscou a adoção pode ser resultado de um viés devido à origem dos adotantes ser de Botucatu. Assim, este resultado não permite inferir sobre a preocupação das pessoas com o espaço destinado a estes animais após a adoção. Além disso, a população de áreas rurais da cidade pode não buscar animais para adoção nos dois locais onde o estudo foi executado, sendo essa uma justificativa plausível para poucos adotantes residirem na área rural.

Embora a maior parte das adoções tenham sido realizadas para os próprios adotantes, aproximadamente ¼ delas foram realizadas para terceiros podendo resultar em abandono, a exemplo do observado em estudo nos EUA com cães adotados para filhos ou netos (20). Uma orientação adequada sobre a não adoção de animais para outras pessoas pode diminuir este tipo de adoção e suas consequências. O fato de as pessoas se prepararem mais para as adoções realizadas no canil municipal, mesmo que de forma não significativa, reforçam a hipótese de que essas pessoas realizam a adoção de forma mais consciente. A significância estatística nesse caso deve ser interpretada com cautela devido ao restrito número de entrevistados.

A feira de doações é realizada aos finais de semana em uma praça central da cidade, dias em que há um grande número de transeuntes no local, os quais podem se sensibilizar com a condição de abandono dos animais e acabar realizando a adoção pelo sentimento, e não pelo real desejo em efetuar a adoção, isto é reforçado pelo fato de que pessoas com mais lazer executam a adoção na feira de doações. É possível que a exposição dos animais favoreça a ocorrência de adoções realizadas de forma mais impulsiva, ocasionando adoções que tenham maior chance de falhar por serem realizadas sem reflexão sobre o impacto que terá na vida do indivíduo ou da família em questão. Nos Estados Unidos, não houve diferença entre satisfação e sucesso da adoção de acordo com locais de adoção, fossem em feiras ou abrigos públicos (20). Cabe ressaltar, entretanto, que nos locais onde o estudo foi realizado havia diversas ferramentas que auxiliavam na adoção dos cães e que não estão disponíveis aos adotantes em Botucatu, como uma entrevista de triagem para melhor orientar o adotante em relação ao animal que ele deve escolher, ou oferecer a opção de devolver o animal caso haja problemas pós-adoção.

Em relação ao status de castração do animal, é interessante notar que apesar da legislação brasileira atualmente em vigor não exigir do poder público a esterilização de animais em seu poder antes de eles serem doados, a comunidade acadêmica médico veterinária e alguns Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) tem sugerido e realizado a castração dos animais antes da doação como uma forma de controlar a superpopulação e de incentivar a guarda responsável pelos proprietários. Dentro deste contexto, a aceitação de

animais castrados por grande parte da população sugere que atividades educativas sobre guarda responsável, que são realizadas há mais de cinco anos em Botucatu, possam ser um caminho viável para a conscientização da população sobre a necessidade do controle populacional pela castração. Em relação às raças mais procuradas durante a adoção, a constatação de que 72,4% dos adotantes buscavam animais sem raça definida é de especial importância, pois sugere que os animais não são adotados pensando em um possível status social que a raça possa trazer. A idade de animal mais buscada para adoção era de filhotes (68,9%). Este resultado já era esperado visto que os filhotes de até três meses serem considerados mais sociáveis (21). Ao mesmo tempo, o fato de nenhum adotante ter buscado um animal com mais de oito anos pode representar um desafio aos órgãos de controle animal, que podem ser obrigados a retirar a guarda de um animal que depois provavelmente terá problemas em ser realojado. O porte do animal pode não ser determinante para definir a adoção, entretanto essa característica está relacionada com o insucesso do processo (14, 15). Isto pode ser um problema principalmente se o proprietário não estiver orientado de que o animal pode crescer mais do que o esperado, em especial se a adoção for de filhotes ou de animais sem raça definida, onde não se há parâmetros para comparar como o animal ficará uma vez adulto.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com estudos prévios que mostram existir muitos fatores envolvidos por trás da escolha de uma pessoa em adotar um cão (22). Apesar deste estudo não ter avaliado a eficácia das adoções de acordo com critérios que levaram o indivíduo a buscar a adoção ou as características da adoção (local em que foi realizada, se o adotante se preparou previamente, se o adotante pensou em um nome para o animal, entre outras), a avaliação de cada fator em relação ao percentual de adoções bem sucedidas ao longo do tempo surge como próximo passo dentro desta linha de pesquisa.

## CONCLUSÕES

Os adotantes de cães de área urbana são adultos, de classe socio-econômica C e B, residem com um companheiro(a) e possuem filhos, não realizaram adoções de animais em outros momentos da vida, residem em casas, não adotam o animal para terceiros e se preparam de alguma forma para a adoção.

As motivações que levam uma pessoa a buscar a adoção de um cão são diversas, variando desde as experiências prévias terem sido agradáveis, promessas, afetividade a animais e até mesmo a impulsão, sendo esta última mais notada nas adoções que ocorreram na feira de doações.

Os resultados observados associados à bibliografia disponível sugerem que fornecer mais informações aos adotantes quanto à responsabilidade que a adoção de um animal representa, aplicar métodos de triagem de adotantes que permitam dissuadir pessoas que querem adotar animais por motivações impulsivas bem como métodos de triagem de adotantes de forma a direcioná-los aos animais que mais atendam suas necessidades possam aprimorar o processo de adoção.

## PARECER DOS COMITÊS DE ÉTICA

Este projeto teve sua execução aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FMVZ da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, protocolo número 124/2010-CEUA, aprovado na data – e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, protocolo número 3614-2010.

**REFERÊNCIAS**

1. Baun MM, Oetting K, Bergstrom N. Health benefits of companion animals in relation to the physiologic indices of relaxation. *Holist Nurs Pract*. 1991;5(2):16-23.
2. Williams AF, Wells JK. Characteristics of vehicle-animal crashes in which vehicle occupants are killed. *Traffic Inj Prev*. 2005;6(1):56-9.
3. Rowden P, Steinhardt D, Sheehan M. Road crashes involving animals in Australia. *Accid Anal Prev*. 2008;40(6):1865-71.
4. De Keuster T, Lamoureux J, Kahn A. Epidemiology of dog bites: a Belgian experience of canine behaviour and public health concerns. *Vet J*. 2006;172(3):482-7.
5. Raghavan M. Fatal dog attacks in Canada, 1990-2007. *Can Vet J*. 2008;49(6):577-81.
6. Cornelissen JM, Hopster H. Dog bites in the Netherlands: a study of victims, injuries, circumstances and aggressors to support evaluation of breed specific legislation. *Vet J*. 2010;186(3):292-8.
7. Benitez A, Rodrigues GG, Gonçalves DD, Burke JC, Alves LA, Müller EE, et al. Leptospirosis in stray dogs found in university campus: serological evaluation and urine direct exam. *Semina Cienc Agrar*. 2010;31(1):191-6.
8. Wiwanitkit V. Dog-associated zoonosis [author reply]. *Prev Vet Med*. 2010;95(1-2):163.
9. Reichmann MLAB, Figueiredo ACC, Pinto HBF, Nunes VFP. Controle de populações de animais de estimação [manual técnico, 6]. São Paulo: Instituto Pasteur; 2000.
10. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2010: total população São Paulo [Internet]. Brasília; 2010 [acesso em 2010 Dez 07]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/tabelas\\_pdf/total\\_populacao\\_sao\\_paulo.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/tabelas_pdf/total_populacao_sao_paulo.pdf)
11. Instituto Pasteur. Mínima estimada cães [Internet]. São Paulo; 2011 [acesso em 2011 Fev 28]. Disponível em: [http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/news/ppi2010\\_res.asp](http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/news/ppi2010_res.asp)
12. Fantuzzi JM, Miller KA, Weiss E. Factors relevant to adoption of cats in an animal shelter. *J Appl Anim Welf Sci*. 2010;13(2):174-9.
13. Posage JM, Bartlett PC, Thomas DK. Determining factors for successful adoption of dogs from an animal shelter. *J Am Vet Med Assoc*. 1998;213(4):478-82.
14. Shore ER. Returning a recently adopted companion animal: adopters' reasons for and reactions to the failed adoption experience. *J Appl Anim Welf Sci*. 2005;8(3):187-98.
15. Mondelli F, Prato Previde E, Verga M, Levi D, Magistrelli S, Valsecchi P. The bond that never developed: adoption and relinquishment of dogs in a rescue shelter. *J Appl Anim Welf Sci*. 2004;7(4):253-66.

16. Associação Nacional de Empresas de Pesquisa - ANEP/ABEP. Critério de Classificação Econômica Brasil [Internet]. Brasília; 2010 [acesso em 2010 Out 22]. Disponível em: <http://www.datavale-sp.com.br/CCEB.pdf>
17. Hendrie HC, Osuntokun BO, Hall KS, Ogunniyi AO, Hui SL, Unverzagt FW, et al. Prevalence of Alzheimer's disease and dementia in two communities: Nigerian Africans and African Americans. *Am J Psychiatry*. 1995;152(10):1485-92.
18. Goodman LA. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics*. 1965;7(2):247-54.
19. Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat*. 1964;35(2):716-25.
20. Neidhart L, Boyd R. Companion animal adoption study. *J Appl Anim Welf Sci*. 2002;5(3):175-92.
21. Marder A, Duxbury MM. Obtaining a pet: realistic expectations. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2008;38(5):1145-62.
22. Diesel G, Pfeiffer DU, Brodbelt D. Factors affecting the success of rehoming dogs in the UK during 2005. *Prev Vet Med*. 2008;84(3-4):228-41.

**Recebido em: 09/04/12**

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

## PERFIL DE AGLUTININAS ANTI-LEPTOSPIRA E ANTI-BRUCCELLA E CONDIÇÕES SANITÁRIAS DE OVINOS DA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

Márcia Marinho<sup>1</sup>  
Luiz Cláudio Nogueira Mendes<sup>2</sup>  
Carlos Noriyuki Kaneto<sup>3</sup>  
Cilene Vidovix Taparo<sup>4</sup>  
João Otávio Rodrigues Bernardes<sup>5</sup>  
Adriana Longo Lombardi<sup>5</sup>  
Sílvia Helena Venturoli Perri<sup>6</sup>  
Adonis Benvenuto Baldasso<sup>7</sup>  
Matheus Marussi Ribeiro<sup>7</sup>

### RESUMO

A ovinocultura tem se destacado de forma crescente no agronegócio, transformando o cenário produtivo do Brasil, contribuindo para o desenvolvimento sócio-econômico do país. O trabalho teve como objetivo geral verificar a ocorrência de Brucelose e de Leptospirose em ovinos da região noroeste do estado de São Paulo. Determinar a prevalência dos principais sorovares de *Leptospira* presentes na região e estabelecer o diagnóstico da situação deste setor. Das 1222 amostras de soros de ovinos, provenientes de 49 propriedades. Todas as amostras não reagiram sorologicamente aos testes comprobatórios para brucelose, frente aos antígenos de *B. abortus* e *B. ovis* utilizados nos testes de 2-ME e IDGA, respectivamente. O teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM), revelou que 19,14% (232/1212) das amostras foram reagentes para um ou mais sorovares, com títulos variando entre 100 a 800. O sorovar mais incidente na região foi Hebdomadis, Sentot e Shermani com (18,10%, 11,64% e 8,62%, respectivamente). Ao traçarmos o perfil do sistema de criação de ovinos na região, verificamos que a maioria dos rebanhos são compostos por mais de uma raça sendo que a finalidade principal destina-se ao corte. Foram verificados a presença de abortamentos e de diarreias e a inexistência de critérios sobre o manejo destinado aos ovinos, tornando-se emergencial a elaboração de programas de manejo sanitário que visem melhorar o desenvolvimento da produtividade da ovinocultura no país..

**Palavras-chave:** brucelose, leptospirose, ovinos, sanidade, sorologia.

<sup>1</sup> Professora Adj. da disciplina de Microbiologia- Departamento de Produção e Saúde Animal- Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Medicina Veterinária FMVA- Unesp Araçatuba, SP. Endereço: Rua: Clóvis Pestana, 793. CEP: 16050-680, Araçatuba-SP. Telefone: (18) 3636-1382. E-mail: mmarinho@fmva.unesp.br

<sup>2</sup> Professor Adj. da disciplina de Clínica Médica de Grandes Animais - Departamento de Clínicas e Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária FMVA- Unesp Araçatuba, SP. Endereço: Rua: Clóvis Pestana, 793. CEP: 16050-680, Araçatuba-SP. Telefone: (18) 3636-1439. E-mail: lmendes@fmva.unesp.br

<sup>3</sup> Professor Ass. Dr. da disciplina de Parasitologia - Departamento de Produção e Saúde Animal- Faculdade de Medicina Veterinária FMVA- Unesp Araçatuba, SP. Endereço: Rua: Clóvis Pestana, 793. CEP: 16050-680, Araçatuba-SP. Telefone: (18) 3636-1382. E-mail: kaneto@fmva.unesp.br

<sup>4</sup> Assistente de Suporte Acadêmico II - Departamento de Produção e Saúde Animal- Faculdade de Medicina Veterinária FMVA- Unesp Araçatuba, SP. Endereço: Rua: Clóvis Pestana, 793. CEP: 16050-680, Araçatuba-SP. Telefone: (18) 3636-1388. E-mail: cilene@fmva.unesp.br

<sup>5</sup> Pós-Graduando em Ciência Animal Faculdade de Medicina Veterinária FMVA- Unesp Araçatuba, SP. Endereço: Rua: Clóvis Pestana, 793. CEP: 16050-680, Araçatuba-SP. Telefone: (18) 3636-1388. E-mail: joaootavio\_br@hotmail.com

<sup>6</sup> Professora Ass Dra. da disciplina de Estatística - Departamento de Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária FMVA- Unesp Araçatuba, SP. Endereço: Rua: Clóvis Pestana, 793. CEP: 16050-680, Araçatuba-SP. Telefone: (18) 3636-1382. Email: shvperri@fmva.unesp.br

<sup>7</sup> Graduando da Faculdade de Medicina Veterinária FMVA- Unesp Araçatuba, SP.. Endereço: Rua: Clóvis Pestana, 793. CEP: 16050-680, Araçatuba-SP. Telefone: (18) 3636-1388. E-mail: abbaldasso@hotmail.com

## PROFILE OF AGGLUTININS ANTI-BRUCELLA AND ANTI-LEPTOSPIRA AND HEALTH CONDITIONS OF SHEEP FROM NORTHWEST REGION OF THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

### ABSTRACT

The sheep industry has become increasingly prominent in agribusiness, transforming the stage production of Brazil, and thus contributes more to the socio-economic development of the country. The work aimed to verify the occurrence of brucellosis and leptospirosis in sheep from northwestern São Paulo state. In addition to determining the prevalence of major *Leptospira* in the region and to trace the diagnosis of sheep breeding in this part of the country. All the 1222 sheep serum samples from 49 properties did not react serologically to evidentiary testing for brucellosis, compared to antigens of *B. abortus* and *B. ovis* used in the testing of 2-ME and IDGA, respectively. The Microscopic Agglutination Test (MAT) test revealed that 19.14% (232/1212) of samples were positive for one or more serovars, with titles ranging from 100 to 800. The most frequent serovar was hebdomadis in the region, with Sentot and Sherman (18.10%, 11.64% and 8.62%, respectively). By profiling the system of sheep farming in the region, we found that most herds are composed of more than one race being the main purpose is for the court. According to the scheme adopted immunoprophylactics there is a homogeneous set schedule. It adopts the use of anti-helminth, non-prescription veterinary antibiotic. There is also the presence of diarrhea and abortions and the lack of criteria for los ovinos on management, making it the need for emergency development of programs for disease control, schema immunoprophylactics adequate sanitation and hygienic measures in sheep breeding.

**Keywords:** brucellosis, leptospirosis, sheep, animal health, serology

## PERFIL DE AGLUTININAS ANTIBRUCELLA Y ANTILEPTOSPIRA Y CONDICIONES SANITARIAS DE OVINOS DE LA REGIÓN NOROESTE DEL ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

### RESUMEN

El sector ovino se ha destacado en el ámbito de los agronegocios con la consecuente transformación del escenario productivo Brasileño, lo que contribuye al desarrollo socioeconómico del país. Este trabajo tuvo como objetivo general identificar la presencia de brucelosis y de leptospirosis en ovinos de la región noroeste de São Paulo. Además de determinar la prevalencia de las principales serovares de *Leptospira* en esa región y realizar un diagnóstico de situación de este sector productivo. Ninguna de las 1.222 muestras de suero de ovejas de 49 propiedades reaccionaron a las pruebas serológicas contra los antígenos de *B. abortus* y *B. ovis* utilizados en la prueba de 2-ME y de IDGA, respectivamente. La prueba de aglutinación microscópica (MAT) reveló que 19,14% (232/1212) de las muestras fueron positivas para uno o más serotipos, con títulos que van desde 100 hasta 800. Los serotipos más frecuentes fueron Hebdomadis, Sentot y Sherman (18,10%, 11,64% y 8,62%, respectivamente). Al presentar el perfil del sistema de ganadería ovina en la región, se encontró que la mayoría de los rebaños están compuestos por más de una raza y que el propósito principal es la producción de carne. Fue indagada la presencia de abortos y diarreas. La ausencia de criterios preestablecidos sobre el manejo ovino hace necesaria la creación emergente de programas de manejo sanitario para la mejoría y el desarrollo de la productividad de este sector en el país.

**Palabras clave:** brucelosis, leptospirosis, ovelhas, salud animal, serología.

## INTRODUÇÃO

A ovinocultura tem se destacado de forma crescente no agronegócio, transformando o cenário produtivo do Brasil, e assim contribuindo crescentemente para o desenvolvimento sócio-econômico do país. O mercado de ovinos está em franco crescimento movimentando milhões de reais no mercado pecuário nacional (1) motivado, entre outros fatores, pelo aumento do consumo da carne que passou de 200g/habitante (1998) para 700g/habitante (2004) e maior retorno financeiro para o criador com acréscimo de 30% do preço da carne para o produtor (2), entretanto, poucos programas tem sido criados exclusivamente para este setor da pecuária. A região Sudeste tem se destacado na criação de ovinos com crescimento de 34,2% do seu rebanho (3). O Estado de São Paulo, entre 1995 e 2006, observou o crescimento do rebanho da ordem de 75,04%, que foi resultado dos investimentos na produção nos últimos anos e a região noroeste do estado contribui com um número de 38.872 animais deste total, formando rebanhos de várias raças e origens de vários estados e países vizinhos (4).

Atualmente, encontra-se em fase de implantação no país o Programa Nacional De Sanidade de Caprinos e Ovinos (PNSCO) que foi aprovado pela Instrução Normativa nº 87 da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), de 10 de dezembro de 2004, o qual tem por objetivo o controle e a erradicação das doenças de caprinos e ovinos, por meio de ações sanitárias e de vigilância epidemiológica definidas pela SDA e executadas pelos serviços oficiais e médicos veterinários cadastrados (5).

A epididimite dos carneiros encontra-se priorizada como uma das enfermidades que compõem o programa. A brucelose ovina é uma doença infecciosa crônica dos ovinos causada por *Brucella ovis* e caracterizada por vários graus de epididimite e orquite em carneiros, placentite, aborto e elevada mortalidade de cordeiros (6, 7). A prevalência da infecção por *B. ovis* é bastante variável em várias partes do mundo e depende, também, do método e/ou da prova diagnóstica utilizada, perfazendo de 2,4-26,0% dos carneiros examinados nos trabalhos realizados em outros países (8, 9).

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial que acomete animais domésticos, silvestres e o homem. Assume um caráter epidêmico em determinadas regiões, com maior frequência em países tropicais e em desenvolvimento (10), acarretando com isto sérios problemas sócio-econômicos. Apesar de não estar presente no contexto geral das enfermidades a serem controladas e erradicadas pelo PNSCO, o conhecimento da sua prevalência e dos principais sorovares que incidem na região noroeste do estado de São Paulo é de vital importância para se elaborar estratégias de controle.

Do ponto de vista epidemiológico, é importante o conhecimento das espécies animais que atuam como reservatórios, e quais os sorovares prevalentes em determinada área. Alguns sorovares apresentam certa eleição para algumas espécies, sendo assim chamados de hospedeiros primários, nos quais causam doença moderada com pequenos danos. Estes, ainda podem albergar a *Leptospira* em seus túbulos renais, onde permanecem livres da ação dos anticorpos, e eliminá-las de forma intermitente pela urina por longos períodos (11), atuando assim como fonte de infecção para o homem e outros animais. O impacto da leptospirose em termos da saúde pública reflete-se no alto custo do tratamento dos seres humanos acometidos com letalidade da ordem de 5% a 20%. No entanto, quanto à saúde animal, as conseqüências dessa infecção são particularmente da esfera econômica, tendo em vista o envolvimento de bovinos, equinos, suínos, caprinos e ovinos, espécies animais produtoras de alimentos nobres como a carne, o leite, e ainda de produtos de interesse industrial, tais como a lã e o couro (12).

Pelo exposto, o conhecimento da soroprevalência de enfermidades relacionadas diretamente com a esfera reprodutiva e as condições sanitárias destinadas ao rebanho é de extrema importância para a saúde animal e pública.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os animais foram procedentes de 49 propriedades localizadas na região noroeste do Estado de São Paulo, englobando 23 municípios: Araçatuba, Andradina, Birigui, Glicério, Mirandópolis, Nova Granada, Guaraçaí, Guararapes, Onda Verde, Tupã, Santópolis, Luizânia, Urupês, Macatuba, Areiópolis, Alto Alegre, Avaré, Promissão, Guararapes, Mirassol, Valparaíso, Bragança Paulista e Fronteira.

A composição do tamanho da amostra foi feita de forma aleatória, sorteio dos animais em idade reprodutiva e com resultado negativo para prenhez, no caso das fêmeas, uma vez que dependendo do período da gestação do animal, principalmente na brucelose, poderia haver uma influência na resposta sorológica.

A pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* foi realizada pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) em lâmina (13). Considerou-se positivo o soro que na diluição 1:100 aglutinou pelo menos 50% das leptospiras. O título foi representado pela recíproca da maior diluição em que foram encontradas 50% das leptospiras aglutinadas.

Para o diagnóstico de brucelose realizou-se o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) de acordo com os procedimentos laboratoriais e interpretações recomendados pelo MAPA (14). Posteriormente, todas as amostras que reagiram ao teste de triagem foram submetidas ao teste confirmatório, do 2-Mercaptoetanol (2-ME) conforme os critérios e interpretação do PNCEBT (15). O antígeno utilizado para a prova de Imunodifusão em gel de Agar (IDGA) (14), foi produzido pelo Laboratório Tecnológico do Paraná (TECPAR). Para análise da condição higiênico sanitária do rebanho utilizou-se um questionário que foi preenchido pelo criador no momento da visita.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram colhidas 1222 amostras de soro de ovinos de 49 propriedades, diferentes raças, sendo 15,5% (189/1222) de machos, 72,9% (891/1222) de fêmeas vazias e de 11,6% (142/1222) soros que não possuíam identificação com relação ao sexo do animal, sendo todas as amostras provenientes de animais adultos em período de reprodução. A população estimada na região é de aproximadamente 11.222 animais, o que determinou a colheita de uma amostragem de 10,89% do rebanho. O maior número de amostras foi proveniente de animais das cidades de Araçatuba (33,4%), Birigui (18,8%), Nova Granada (8,6%) e Guararapes (7,9%). Das 49 propriedades estudadas, em 15 os proprietários se dispuseram a responder ao inquérito sanitário, entretanto alguns não o fizeram na íntegra; 22 proprietários não manifestaram interesse em participar e outras 12 propriedades foram incluídas no estudo durante as provas de ganho de peso realizadas no campus de nossa Universidade, não sendo possível o preenchimento do inquérito.

Ao traçar o perfil das criações de ovinos na região verificou-se que a maioria dos criadores optam por rebanhos mistos, compostos por duas ou mais raças do que rebanhos formados por uma única raça, como pode ser visualizado nas tabelas 1 e 2. O inquérito sanitário mostra a presença de abortamentos, e de enfermidades que na maioria das vezes permaneceram sem diagnóstico. Os resultados revelam o uso indiscriminado de drogas antimicrobianas e anti-helmínticas sem nenhuma prescrição técnica, como também a adoção de esquemas de vermifugação variados, compostos de duas doses, sendo uma inicial e outra de reforço com intervalos variados entre as doses. Ressalta-se ainda a inexistência de um esquema imunoprofilático, atrelado a um calendário vacinal pré-estabelecido. A criação

consorciada foi constatada, principalmente com bovinos e equinos, embora o co-pastoreio não tenha sido observado.

Tabela 1. Composição dos rebanhos de ovinos formados por uma única raça, região noroeste do estado São Paulo, 2011

Raça	n	%
Santa Ines	7	30,43
Suffolk	5	21,73
Dorper	5	21,73
Ile de France	4	17,39
Hampshire down	1	4,38
Texel	1	4,38
Total	23	100

Tabela 2. Composição dos rebanhos de ovinos formados por duas ou mais raças, região noroeste do estado São Paulo, 2011

Raça	n	%
Dorper /St Inês	8	30,76
St Inês/Suff	6	23,08
St Inês/Suff/HigL	2	7,69
Suff/HigL/Primavera/Texel	2	7,69
St Inês /SRD	2	7,69
SRD	6	7,69
Total	26	100

St Inês= Santa Inês

Suff= Suffolk

HigL= Highlander

SRD=Sem raça definida

Das 1222 amostras testadas à prova do AAT, somente 0,33% (4/1222) foram reagentes, das quais três provinham de rebanhos da cidade de Araçatuba e uma da cidade de Birigui. Posteriormente, quando submetidas ao teste de SAL, uma apresentou título igual a 50, outra a 25 e uma não reagente, entretanto quando submetidas ao 2 ME todas foram não reagentes. Com relação ao teste de IDGA, frente ao antígeno de *B.ovis*, todas as amostras foram não reagentes. Para a Soroaglutinação Microscópica (SAM), do total de 1212 amostras de soros testadas, 19,14% (232/1212) foram reagentes para pelo menos um sorovar. A prevalência dos sorovares com títulos variando de 100 a 800 foram: Hebdomadis (18,10%); Sentot (11,64%); Shermani (8,62%); Hardjobovis e Andamana (6,90%); Hardjo CTG, Wolffi e Copenhageni (5,60%); Bratislava (5,17%); Canicola (3,45%); Autumnalis (2,59%); Icterohaemorrhagiae, Patoc, Hardjo prajitno, Hardjo, Djasiman e Gryppotyphosa (2,16%); Whitcombi (1,72%); Castelonis (1,29%); Australis, Cynopteri e Hardjo miniswajezak (0,86%) e Butembo, Javanica e Tarassovi (0,43%). Cento e dez animais (47,41%) apresentaram título igual a 800, entretanto, outros 122 (52,59%) soros apresentaram título  $\geq 100$  e  $\leq 800$  na MAT. A análise dos resultados nos permite inferir que a infecção por amostras lisas e ou rugosas de *Brucella* não se caracteriza em um problema sanitário para o rebanho ovino da região noroeste do estado de São Paulo, semelhantes aos resultados encontrados anteriormente por Marinho e Mathias (16).

A presença de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em 19,14% (232/1212) das amostras de soros de ovinos, com mais de um ano de idade e clinicamente sadios, em animais criados

extensivamente em fazendas de 20 municípios da região noroeste do estado de São Paulo e proximidades, indicando que a enfermidade está presente nos rebanhos, podendo acarretar grandes prejuízos na produção de ovinos, uma vez que a região se encontra em franca expansão na ovinocultura.

Verificou-se uma variação nos títulos aglutinantes de 100 até 800, nas 232 amostras reagentes. Desses, 110 (47,41%) apresentaram título igual a 800, e 69 (29,74%) apresentaram título < 800 demonstrando assim uma situação epidemiológica grave, por demonstrar que a leptospirose está ativa nos rebanhos. O sorovar Hardjo é o mais frequente em bovinos e ovinos em todo o mundo, portanto o maior causador de problemas reprodutivos em ovelhas e de morte de cordeiros. No Brasil, outros sorovares já foram descritos como responsáveis por reações sorológicas como: Australis, Autumnalis, Bratislava, Butembo, Canicola, Castellonis, Grippyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Pomona e Tarassovi (17).

No presente trabalho o sorovar predominante foi o Hebdomadis, seguido pelo Sentot, o qual tem sido isolado recentemente no Brasil. Ao desenvolverem um estudo sobre a soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos das mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Herrman et al. (17) foram os primeiros a detectar a presença do sorovar Sentot em ovinos, sugerindo a necessidade da inclusão do mesmo no catálogo de antígenos utilizados nas provas sorológicas de rotina. A necessidade de isolamento e tipificação de novos sorovares é necessária sempre que é detectada a primeira vez em uma região (18).

A ocorrência de sorovarietades como Hadjobovis, Hardjo CGT e Wolffi neste trabalho, talvez, prenda-se ao fato da criação consorciada com bovinos. A presença de reações para o sorovar Canicola aponta os cães como os possíveis transmissores deste sorovar para os ovinos, uma vez que é crescente a prática da utilização de cães pastoreiros em muitas propriedades.

Os resultados ainda revelaram a prevalência, embora reduzida, do sorovar Icterohaemorrhagiae (2,16%), destacando a necessidade da inclusão de programas de desratização junto às propriedades. A grande variedade de resultados encontrados sobre a prevalência da leptospirose e dos sorovares podem estar associados a alguns fatores relacionados à epidemiologia da doença como: topografia, região, temperatura, umidade, precipitações pluviométricas, reservatórios selvagens e domésticos entre outros fatores ambientais, que podem afetar o seu comportamento (19).

## CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a população ovina da região noroeste do estado de São Paulo está voltada para o sistema extensivo, destinada ao corte, tendo como raças predominantes a Santa Inês, Suffolk, Texel e Primavera. Há a ocorrência de doenças e de abortamentos sem que haja diagnóstico prévio. Observou-se ainda a adoção de práticas inadequadas ao sistema de criação, como o uso indiscriminado de drogas antimicrobianas e anti-helmínticas sem prescrição técnica, associados a ausência de um esquema imunoprolático pré-estabelecido e direcionado à ovinos. A prática da criação consorciada, principalmente com bovinos e eqüinos é uma realidade, embora não haja o co-pastoreio.

Com relação à ocorrência de doenças relacionadas à esfera reprodutiva, verificou-se que a leptospirose encontra-se presente nos rebanhos da região, sendo os sorovares Hebdomadis, e o Sentot, os mais prevalentes. Todavia, não foram encontrados animais sororreagentes para Brucelose, frente aos antígenos de *B. abortus* e *B. ovis*, embora tenha sido observado a ocorrência de abortamentos nas criações. Pelo exposto, concluímos que a ovinocultura na região noroeste de São Paulo vem despontando no cenário nacional como uma grande perspectiva econômica. Entretanto ressalta-se, a necessidade da implantação iminente, de um programa sanitário direcionado a ovinocultura que venha ao encontro das necessidades do

setor, estabelecendo boas práticas de manejo, associadas a medidas preventivas que irão repercutir futuramente na criação de ovinos, agregando valores ao bem-estar animal, ao setor econômico e conseqüentemente, minimizando os problemas de saúde pública.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP pelo financiamento do projeto n°. 57280-7/2008 e bolsas de Iniciação Científica n° 2008/57981-5 e 2009/01662-1 e ao CNPq.

## REFERÊNCIAS

- 1- Roncoletta M. Biotecnologias da reprodução em ovinos e caprinos. *Not Tortuga Ovinos Caprinos*. 2008;53(ed esp):49-51.
- 2- Da Costa RLD. Manejo reprodutivo intensivo de ovinos. *Not Tortuga Ovinos Caprinos*. 2008;53(ed esp):47-8.
- 3- Scot Consultoria. Ovinos ou bovinos? [Internet]. Bebedouro; 2006 [acesso em 2008 Maio 10]. Disponível em: <http://www.scotconsultoria.com.br/noticias.asp?idA=&pg=101&abssize=25>
- 4- Instituto de Economia Agrícola. Perspectiva da produção de ovinos no estado de São Paulo. *Anal Indic Agroneg*. 2008;3:1-4.
- 5- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento [Internet]. Brasília; 2010 [acesso em 2010 Junh 10]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/portal/page?\\_pageid=33,982143&\\_dad=portal&\\_schema=P ORTAL](http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,982143&_dad=portal&_schema=P ORTAL)
- 6- Homse AC, Casaro AP, Campero CM. Infertilidad em ovejás por *Brucella ovis*. *Vet Argent*. 1995;12:243-9.
- 7- Baigún R, Conigliaro AS, Luna F. Aislamiento de *Brucella ovis* y control de reaccionantes serológicos en epididimitis ovina. *Vet Argent*. 2000;17:103-7.
- 8- Nillo L, Macdonald DW, Godkin GF, Stone MW. Ovine brucellosis in Alberta. *Can Vet J*. 1986;27:245-9.
- 9- Torres EDN, Aparicio ED, Quezada FV, Tavera FT, Güemes FS. Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* em sementales ovinos jóvenes. *Vet Mex*. 1997;28:241-5.
- 10- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett M, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3:757-71.
- 11- Cordeiro F, Sulzer CR, Ramos AA. *Leptospira interrogans* in several wildlife species in Southeast, Brazil. *Pesqui Vet Bras*. 1981;1:19-29.

- 12- Badke MRT. Leptospirose [Internet]. Santa Catarina [acesso em 2007 Out 13]. Disponível em: [http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Memorias2001/1\\_manuelrenato.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Memorias2001/1_manuelrenato.pdf)
- 13- World Health Organization. Current problems in leptospirosis research: report of a WHO expert group. Geneva: WHO; 1967. (Technical Report Series, 380).
- 14- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: Inra; 1988.
- 15- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal. Brasília: PNCEBT; 2001.
- 16- Marinho M, Mathias LA. Pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis* em ovinos do estado de São Paulo. *Pesqui Vet Bras*. 1996;16:45-8.
- 17- Herrmann GP, Lage AP, Moreira EC, Haddad JPA, Resende JR, Rodrigues RO, et al. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc Rural*. 2004;34:443-8.
- 18- Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization; 1982. (Who Offset publications, 67).
- 19- Alves CJ. Influência de fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em cinco centros de criação do estado da Paraíba, Brasil [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 1995.

**Recebido em: 25/04/11**  
**Aceito em: 17/10/12**

## PERFIL DE SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE CÃES FRENTE A ANTIMICROBIANOS

Adriana Resmond Cruz<sup>1</sup>  
Antonio Carlos Paes<sup>2</sup>  
Amanda Keller Siqueira<sup>3</sup>

### RESUMO

A passagem de bactérias resistentes dos animais ao homem é possível. As amostras foram coletadas de cães, machos e fêmeas, de diferentes raças e idade, com infecções bacterianas variadas. Foram realizadas cultura e antibiograma das bactérias isoladas (n=100), sendo avaliadas como sensíveis ou resistentes. Porcentagem de resistência do grupo das bactérias Gram-negativas: tetraciclina 83,02%, azitromicina 81,48%, doxiciclina 77,78%, ampicilina 62,96%, ceftiofur e florfenicol 50%, cefalexina 46,3%, enrofloxacino 44,44%, norfloxacino 18,52%, gentamicina 20,37%, levofloxacino 27,78%, amoxicilina + ácido clavulânico 31,48%, ciprofloxacino 31,48%, amicacina e ceftriaxona 33,33%, cloranfenicol e sulfa + trimetoprin 35,19%. Porcentagem de resistência do grupo dos *Streptococcus*: tetraciclina 80%, eritromicina 72%, enrofloxacino e levofloxacino 52%, ampicilina, azitromicina, ciprofloxacino, norfloxacino, penicilina G e sulfa + trimetoprin 48%, amoxicilina + ácido clavulânico 4%, cefalexina 12%, florfenicol 24%, ceftiofur, ceftriaxona e oxacilina 28%, cloranfenicol 32%. Porcentagem de resistência do grupo dos *Staphylococcus* spp: ampicilina 57,14%, sulfa + trimetoprin e tetraciclina 52,38%, amicacina, amoxicilina + ácido clavulânico, gentamicina, levofloxacino, 4,76%; cefalexina, ceftiofur, ceftriaxona e cloranfenicol, 9,52%; vancomicina 13,33%, norfloxacino 19,05%; ciprofloxacino, enrofloxacino e oxacilina 23,81% e azitromicina 33,33%. Os cães são reservatórios de bactérias multidrogas resistentes que podem transmitir por meio de plasmídios os genes de resistência, explicando a resistência de bactérias isoladas de cães à antimicrobianos de uso humano como a vancomicina.

**Palavras-chave:** bactérias multidrogas resistentes, antimicrobianos, cães

### SENSITIVITY PROFILE OF PATHOGENIC ISOLATED BACTERIA FROM DOGS FACING ANTIMICROBIAL

#### ABSTRACT

The transmission of resistant bacteria from animals to humans is possible. Samples were collected from different breeds of dogs in different ages including males and females, with a variety of bacterial infections. The culture and antibiograma of isolated bacteria were analysed (n = 100), being evaluated as sensitive or resistant. Percentage of resistance of Gram-negative bacteria tetracycline 83.02%, azithromycin 81.48%, doxycycline 77.78%, ampicillin 62.96%, ceftiofur and florfenicol 50%, cephalixin 46.3%, enrofloxacin 44.44%, norfloxacin 18.52%, gentamicin 20.37%, levofloxacin 27.78%, amoxicillin + clavulanic acid 31.48%, ciprofloxacin 31.48%, amikacin and ceftriaxone 33.33%, chloramphenicol and

<sup>1</sup> Mestre do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. Distrito de Rubião Jr. s/n. Botucatu-SP. CEP: 18618-000. (14) 3811-6270. aresmond@hotmail.com

<sup>2</sup> Professor Doutor do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. Distrito de Rubião Jr. s/n. Botucatu-SP. CEP: 18618-000. (14) 3811-6270. paesacmi@fmvz.unesp.br

<sup>3</sup> Doutoranda do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. Distrito de Rubião Jr. s/n. Botucatu-SP. CEP: 18618-000. (14) 3811-6270. kellersiqueira@hotmail.com

trimethoprim + sulfa (35.19%). Percentage of resistance of *Streptococcus*: tetracycline 80%, erythromycin 72%, enrofloxacin and levofloxacin 52%, ampicillin, azithromycin, ciprofloxacin, norfloxacin, penicillin G and sulfamethoxazole + trimethoprim 48%, amoxicillin + clavulanic acid 4%, cephalexin 12%, florfenicol 24%, ceftiofur, ceftriaxone, and oxacillin 28%, chloramphenicol 32%. Percentage of resistance of *Staphylococcus* spp: ampicillin 57.14%, sulfamethoxazole + trimethoprim and tetracycline 52.38%, amikacin, amoxicillin + clavulanic acid, gentamicin, levofloxacin, 4.76%, cephalexin, ceftiofur, ceftriaxone, and chloramphenicol 9.52%, vancomycin 13.33%, norfloxacin 19.05% ciprofloxacin, enrofloxacin and oxacillin 23.81% and azithromycin 33.33%. Dogs have resistant-multidrug bacteria that might pass through the plasmid resistant genes, explaining the resistance of isolated bacteria from dogs to human use of antimicrobials such as vancomycin.

**Keywords:** resistant-multidrug bacteria, antimicrobial, dogs

## PERFIL DE LA SENSIBILIDAD DE BACTERIAS PATÓGENAS AISLADAS DE PERROS FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS

### RESUMEN

La transmisión de bacterias resistentes de animales a los seres humanos es posible. Se obtuvieron muestras provenientes de perros, machos y hembras, de diferentes razas y edades, afectados por infecciones bacterianas misceláneas. Se analizaron los cultivos y antibiogramas de las bacterias aisladas (n=100), mismas que fueron clasificadas como sensibles o resistentes. Así, fueron obtenidos los siguientes porcentajes de resistencia entre las bacterias Gram-negativas: tetraciclina 83.02%, azitromicina 81.48%, doxiciclina 77.78%, ampicilina 62.96%, ceftiofur y florfenicol el 50%, cefalexina 46.3%, enrofloxacina 44.44%, norfloxacina 18.52%, gentamicina 20.37%, levofloxacina 27.78%, amoxicilina + ácido clavulánico 31.48%, ciprofloxacina 31.48%, amikacina y ceftriaxona 33.33%, cloranfenicol y sulfametoxazol + trimetoprima 35.19%; entre el grupo de *Streptococcus* spp: tetraciclina 80%, eritromicina 72%, enrofloxacina y levofloxacina el 52%, ampicilina, azitromicina, ciprofloxacina, norfloxacina, penicilina G y sulfametoxazol + trimetoprima el 48%, amoxicilina + ácido clavulánico 4%, cefalexina 12%, florfenicol 24%, ceftiofur, ceftriaxona y oxacilina el 28%, cloranfenicol 32%; y entre el grupo de *Staphylococcus* spp: ampicilina 57.14%, sulfametoxazol + trimetoprima y tetraciclina el 52.38%, amikacina, amoxicilina + ácido clavulánico, gentamicina y levofloxacina el 4.76%; cefalexina, ceftiofur, ceftriaxona y cloranfenicol el 9.52%; vancomicina 13.33%, norfloxacina 19.05%; ciprofloxacina, enrofloxacina y oxacilina el 23.81% y azitromicina 33.33%. Los perros son portadores de bacterias insensibles a varios fármacos, mismas que son capaces de transmitir genes a través de plásmidos. Esto explica el fenómeno de resistencia a algunos antimicrobianos de uso humano, como la vancomicina, de bacterias aisladas en perros.

**Palabras clave:** bacterias resistentes a múltiples-fármacos, antimicrobianos, perros

### INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos é um dos grandes problemas da medicina e da medicina veterinária, e é causada basicamente pela evolução das bactérias, pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural aos mais aptos (1).

A situação é preocupante, pois para a descoberta e produção de novos antimicrobianos são necessários muitos anos e os indivíduos acometidos por micro-organismos resistentes sofrem falhas de tratamento, aumento do custo da terapia e prolongamento do tempo de recuperação o que pode levar a exposição de outros agentes infecciosos altamente patogênicos (1).

O aumento desse fenômeno de resistência é cada vez mais frequente com os animais. Oliveira et al. (2) verificaram a resistência de cepas de *Staphylococcus intermedius* de cães com otite à penicilina G (25,96%), ampicilina (16,67%), eritromicina (27,78), tetraciclina (24,07%) e clindamicina (18,52%).

A transferência de bactérias resistentes dos animais ao homem é possível, sendo um assunto de importância para a saúde pública (3). A relação entre o uso de antimicrobianos em medicina veterinária e a transferência de bactérias resistentes é um assunto que necessita ser mais pesquisado (4). Porém, estudos mostram que a microbiota intestinal de cães saudáveis pode atuar como reservatório de genes ligados à resistência (5).

Descheemaeker et al. (6), estabeleceram alguma identidade de genes de resistência contra glicopeptídeos em *Enterococcus faecium* isolados em porcos e aves e em seres humanos, indicando a possibilidade de troca de marcadores genéticos de resistência entre bactérias isoladas de animais e seres humanos.

O presente trabalho teve como objetivo traçar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de bactérias patogênicas causadoras de diferentes infecções, isoladas de cães.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras foram coletadas de cães, machos e fêmeas, de diferentes idades e raças, com infecções bacterianas variadas.

O material obtido foi semeado em meio de ágar Mac Conkey e base de ágar sangue composta com 7% de sangue ovino desfibrinado. Em seguida, as amostras foram incubadas em condições de aerobiose à 37°C e observadas em 24, 48, 72 e 96 horas.

Para as amostras que apresentaram isolamentos, estas tiveram sua análise macroscópica, microscópica (morfotintorial pelo método de Gram) e bioquímica, seguindo as provas taxonômicas segundo Quinn et al. (7).

As amostras coletadas para o antibiograma seguiram a metodologia sugerida pela ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (8). O meio de cultivo para o antibiograma foi Agar Mueller-Hinton (MHA).

Foram selecionadas e repicadas 4 ou 5 colônias sob teste para 5 mL de meio de cultivo em caldo. O caldo inoculado foi incubado por 2 a 8 horas à temperatura de 37°C, deixando assim o micro-organismo crescer até atingir a turbidez padrão, correspondente a 0,5 da escala de Mac Farland. Dentro de 15 minutos após o ajustamento da turbidez, foi introduzido um swab estéril e não tóxico no inóculo, para colheita de amostra bacteriana, sendo o material assim obtido distribuído homogeneamente pela superfície da placa de Petri para posterior colocação dos discos com os antimicrobianos a serem testados.

Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas a 37 °C, sendo que a leitura das placas foi realizada após 24 horas de incubação. Os diferentes microrganismos foram avaliados como sensíveis ou resistentes, com o grupo intermediário considerado resistente.

A análise dos resultados foi realizada de acordo com os diferentes micro-organismos e drogas testadas, utilizando-se como método estatístico a análise descritiva com porcentagem simples.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O maior grupo isolado foi das bactérias Gram-negativas, sendo identificados 54 micro-organismos. No grupo dos *Streptococcus* spp. foram isoladas 25 amostras e no grupo dos *Staphylococcus* spp. 21 amostras.

No grupo das bactérias Gram-negativas o agente mais isolado foi a *Escherichia coli* (55,55%), seguido de *Proteus* spp. (14,81%) e *Pseudomonas* spp. (11,1%). Também foram isolados: *Klebsiella* spp. (5,55%), *Enterobacter cloacae* (3,70%), *Corynebacterium* spp. (3,70%), *Hafnia alvei* (1,85%), *Pasteurella* spp (1,85%) e *Neisseria* spp (1,85%).

A Tabela 1 mostra a porcentagem de resistência bacteriana frente aos antimicrobianos testados no experimento.

Os antimicrobianos que apresentaram menor eficácia para as bactérias Gram-negativas foram: tetraciclina com 83,02% de resistência, em seguida a azitromicina com 81,48%. Nesse mesmo grupo, alguns antimicrobianos obtiveram baixa eficácia, como é o caso da doxiciclina que apresentou 77,78% de resistência bacteriana, ampicilina 62,96%, ceftiofur 50%, florfenicol 50%, cefalexina 46,3% e enrofloxacino 44,44%. As drogas mais eficazes para essas bactérias foram: norfloxacino 18,52% de resistência bacteriana, gentamicina 20,37%, levofloxacino 27,78%, amoxicilina + ácido clavulânico 31,48%, ciprofloxacino 31,48%, amicacina 33,33%, ceftriaxona 33,33%, cloranfenicol 35,19% e sulfa + trimetoprin 35,19%.

Tabela 1. Porcentagem de resistência bacteriana frente aos antimicrobianos testados, Botucatu 2009.

%	Gram-negativos (n=54)	<i>Streptococcus</i> (n=25)	<i>Staphylococcus</i> (n=21)
amicacina	33,33	NT	4,76
amoxicilina+ác.clavulânico	31,48	4,00	4,76
ampicilina	62,96	48,00	57,14
azitromicina	81,48	48,00	33,33
cefalexina	46,30	12,00	9,52
ceftiofur	50,00	28,00	9,52
ceftriaxona	33,33	28,00	9,52
ciprofloxacino	31,48	48,00	23,81
cloranfenicol	35,19	32,00	9,52
doxiciclina	77,78	NT	NT
enrofloxacino	44,44	52,00	23,81
eritromicina	NT	72,00	NT
florfenicol	50,00	24,00	NT
gentamicina	20,37	NT	4,76
levofloxacino	27,78	52,00	4,76
norfloxacino	18,52	48,00	19,05
oxacilina	NT	28,00	23,81
penicilina G	NT	48,00	NT
sulfametrin	35,19	48,00	52,38
tetraciclina	83,02	80,00	52,38
vancomicina	NT	NT	13,33

\*NT: não testado

A tetraciclina e a doxiciclina foram os fármacos mais ineficazes para as bactérias Gram-negativas, indicando que pode ocorrer reação cruzada entre esses grupos de antimicrobianos. A resistência as tetraciclina provavelmente ocorre em decorrência da aquisição dos

plasmídios R, principalmente nos bacilos Gram-negativos entéricos que são portadores desses elementos genéticos extracromossomais.

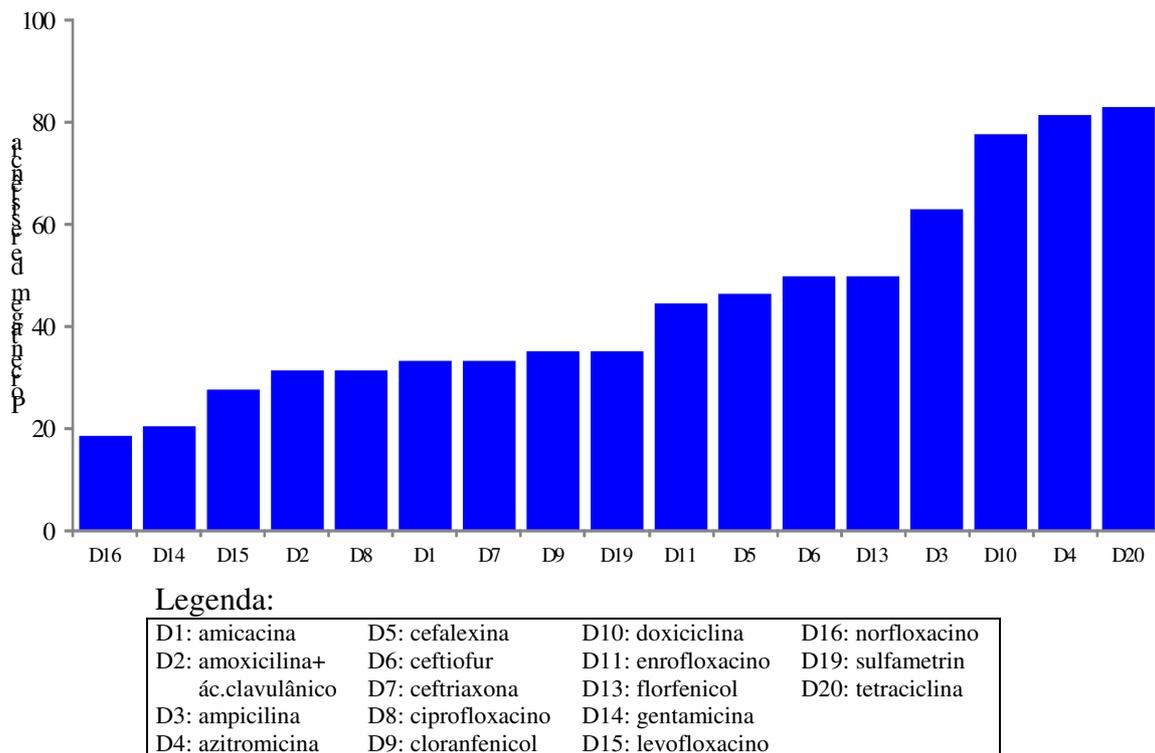


Figura 1. Resistência de bactérias Gram-negativas frente aos antimicrobianos testados, Botucatu, 2009.

A azitromicina apresentou alta porcentagem de resistência, a essas bactérias. Segundo Tavares (9), os bacilos Gram-negativos, dos gêneros *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* são naturalmente resistentes à azitromicina. Porém em relação a outras bactérias Gram-negativas a resistência ocorreu por transferência de plasmídios R que levam à metilação do RNA ribossômico, impedindo a fixação do antimicrobiano no ribossomo da bactéria.

A ampicilina e amoxicilina com ácido clavulânico são fármacos muito utilizados na medicina veterinária, em especial para infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Porém o desempenho de ambas foi baixo, em especial a ampicilina, confirmando a afirmação do aumento drástico da sua resistência nos últimos anos em decorrência da ampla utilização na terapêutica, muitas vezes de forma inadequada.

As cefalosporinas de primeira e terceira geração apresentaram alta porcentagem de resistência, especialmente o ceftiofur que foi o mais ineficaz desse grupo de antimicrobianos. Era esperado que a cefalosporina de terceira geração, ceftiofur, apresentasse melhor desempenho do que cefalosporina de primeira geração, cefalexina, porém, a porcentagem de resistência foi semelhante entre ambas. É importante que se leve em consideração que o ceftiofur é um antimicrobiano de custo elevado, muito utilizado em medicina veterinária, mas no presente trabalho apresentou desempenho similar a fármacos mais baratos, não justificando a relação custo-benefício da sua utilização. A ceftriaxona foi a cefalosporina de melhor desempenho frente aos Gram-negativos.

O florfenicol é considerado mais eficaz desse grupo de antimicrobianos devido a possuir um átomo de flúor na posição do carbono 3, local onde o cloranfenicol possui o radical hidroxila o que reduziria o número de locais disponíveis para as reações de acetilação bacteriana, tornando-o mais resistente a inativação por enzimas produzidas por bactérias.

Porém no presente estudo, foi observada maior porcentagem de resistência ao florfenicol do que ao cloranfenicol. Isso pode ter ocorrido pela resistência primária ao florfenicol observada usualmente com a *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* spp. e *Proteus* spp. Em relação aos outros agentes Gram-negativos, pode ter ocorrido a resistência adquirida por transferência de plasmídios com genes de resistência, observada entre as enterobactérias, estreptococos e estafilococos. A baixa eficácia do cloranfenicol frente a esse grupo de bactérias pode ser explicada por sua inativação enzimática, sendo o principal mecanismo de resistência a este antimicrobiano devido à presença nas bactérias resistentes da cloranfenicol-acetiltransferase.

Nas fluorquinolonas também foram observadas altas porcentagens de resistência, em especial ao enrofloxacino. A resistência adquirida é de origem cromossômica e ocorre com frequência nas bactérias Gram-negativas, especialmente a *Pseudomonas aeruginosa*. Em relação ao levofloxacino, ocorreu considerável resistência a esse grupo de bactérias, mesmo sendo o seu uso ainda pouco freqüente na medicina veterinária. Isso pode ser explicado pela resistência cruzada com outras fluorquinolonas muito utilizadas na terapêutica veterinária, como o enrofloxacino. Karaka et al. (10), constataram que a resistência do ciprofloxacino frente a *Escherichia coli* era de 27,6% em humanos e no presente estudo mostrou que essa porcentagem é de 31,48% para cães.

O baixo desempenho da sulfa associada ao trimetoprim no caso de *Pseudomonas* spp. é devido aos genes cromossômicos encontrados nessas bactérias, resultando na impermeabilidade da droga. Em relação à *Klebsiella* spp. a resistência ocorreu pela produção de diidrofolato-redutase, com menos afinidade pelo trimetoprim (9).

A amicacina apresentou baixa eficácia frente as bactérias Gram-negativas. Isso pode ter ocorrido por transferência de plasmídio com genes de resistência (11).

*Streptococcus* spp. foi o grupo que apresentou maior número de cepas resistentes. Os fármacos com baixa eficácia foram: tetraciclina com 80% de resistência, eritromicina 72%, enrofloxacino 52%, levofloxacino 52%, ampicilina 48%, azitromicina 48%, ciprofloxacino 48%, norfloxacino 48%, penicilina G 48% e sulfa + trimetoprim 48% de resistência. Os antimicrobianos mais eficazes para os *Streptococcus* spp. foram: amoxicilina + ácido clavulânico com 4% de resistência, cefalexina 12%, florfenicol 24%, ceftiofur 28%, ceftriaxona 28%, oxacilina 28% e cloranfenicol com 32% de resistência.

Assim como no caso das bactérias Gram-negativas, a tetraciclina apresentou maior porcentagem de resistência frente aos estreptococos, indicando a aquisição de plasmídios R e o seu uso indiscriminado por longo tempo em medicina veterinária como principais causas da resistência.

A azitromicina, assim como a eritromicina, apresentou alta porcentagem de resistência frente a esse grupo de bactérias, que pode ser explicado pela mutação que tem sido encontrada em *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, alterando uma proteína na subunidade 50S, onde se fixa os macrolídeos, não ocorrendo assim a fixação do antimicrobiano ao ribossomo da bactéria (10).

As fluorquinolonas apresentaram baixa eficácia, especialmente o enrofloxacino, com maior porcentagem de resistência frente aos estreptococos em relação aos demais grupos bacterianos. A maior porcentagem de resistência do levofloxacino foi frente aos *Streptococcus* spp. Sendo uma droga praticamente não utilizada em medicina veterinária, pode-se concluir que está ocorrendo resistência cruzada com outros antimicrobianos, o que inviabiliza a prescrição de um fármaco ainda não devidamente utilizado em medicina veterinária. É conhecido que os micro-organismos resistentes às quinolonas podem apresentar resistência cruzada com cefalosporinas, cloranfenicol e tetraciclina (9).

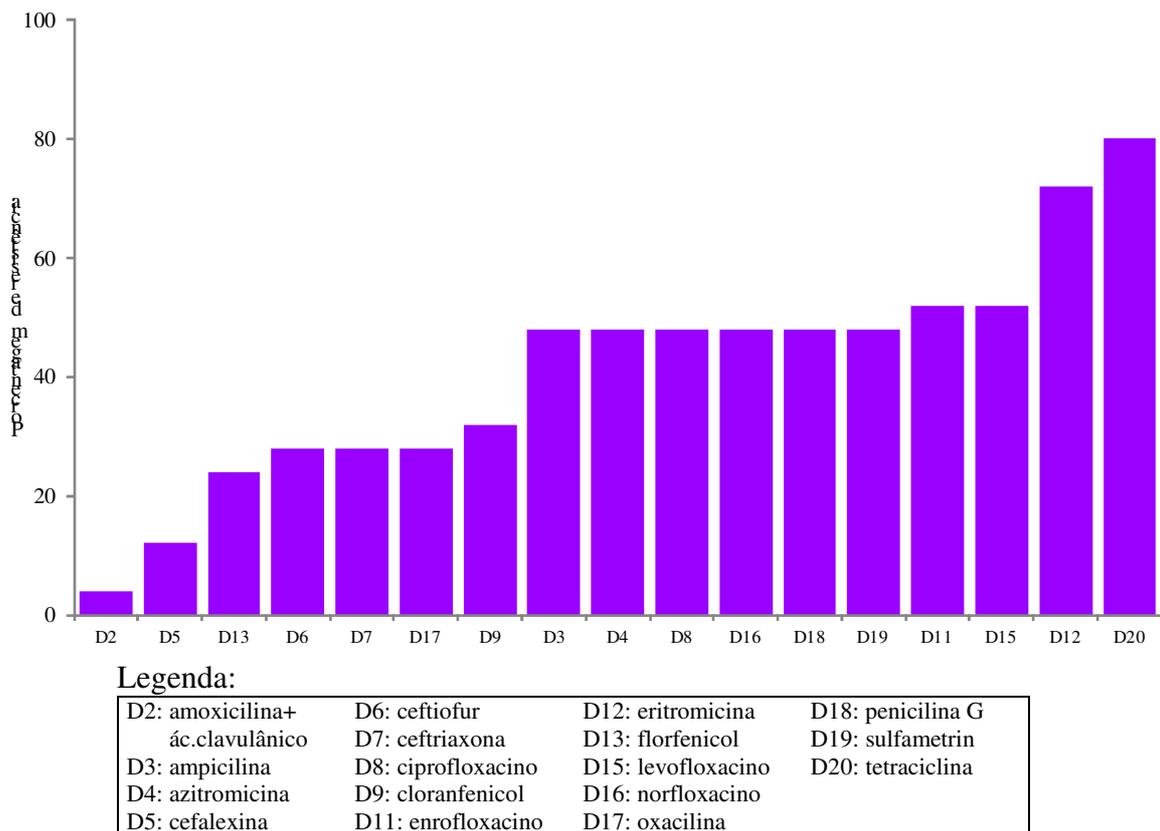


Figura 2. Resistência de *Streptococcus* spp. frente aos antimicrobianos testados, Botucatu 2009

A amoxicilina associada ao ácido clavulânico foi ativa contra *Streptococcus* spp. diferentemente da ampicilina, indicando que não ocorreu resistência cruzada que é extremamente comum nesse grupo de antimicrobiano. Podemos concluir também que o ácido clavulânico tem se mostrado efetivo frente as betalactamases.

A penicilina G apresentou baixa eficácia frente a esse grupo de bactérias, como já foi descrito em estudo anterior (12). Como os estreptococos não produzem beta-lactamases, o mecanismo de resistência está relacionado a modificações nas PBPs, que apresentam menor afinidade pela droga o que diminui a ligação nas mesmas (9).

A oxacilina foi menos eficaz frente aos *Streptococcus*, sendo as alterações das PBPs e alterações da permeabilidade da membrana celular bacteriana os mecanismos mais comuns de resistência.

No grupo dos *Staphylococcus* spp. não ocorreram altos índices de resistência aos antimicrobianos testados. Os fármacos com menor eficácia foram: ampicilina com 57,14% de resistência, sulfa + trimetoprin e tetraciclina 52,38% de resistência. As drogas mais eficazes foram: amicacina, amoxicilina + ácido clavulânico, gentamicina, levofloxacino, com 4,76% de resistência; cefalexina, ceftiofur, ceftriaxona e cloranfenicol, 9,52%; vancomicina 13,33%, norfloxacino 19,05%, ciprofloxacino, enrofloxacino e oxacilina 23,81% e azitromicina com 33,33% de resistência.

A penicilina antiestafilocócica, oxacilina apresentou porcentagem de resistência considerável, sendo resultado de genes cromossômicos que codificam mutações no receptor de ação dos beta-lactâmicos, as PBPs, havendo a produção de novas PBPs (PBP 2a ou PBP2') com pequena afinidade por esses antimicrobianos (9).

A vancomicina é uma das últimas opções terapêuticas contra bactérias multidrogas resistentes em medicina humana e é proibido seu uso na medicina veterinária. Porém, 13,33% dos *Staphylococcus* testados apresentaram resistência a essa droga e como não houve

administração de vancomicina nos cães, podemos supor que ocorreu uma resistência mediada por plasmídios, de bactérias humanas resistentes para os animais. Isto talvez represente o mais que surpreendente achado em termos de resistência bacteriana observado neste trabalho e é um risco real em saúde pública pois expõem as pessoas que tem contato direto com os cães a cepas de *Staphylococcus* totalmente resistentes a um antimicrobiano reservado para situações especiais nos hospitais.

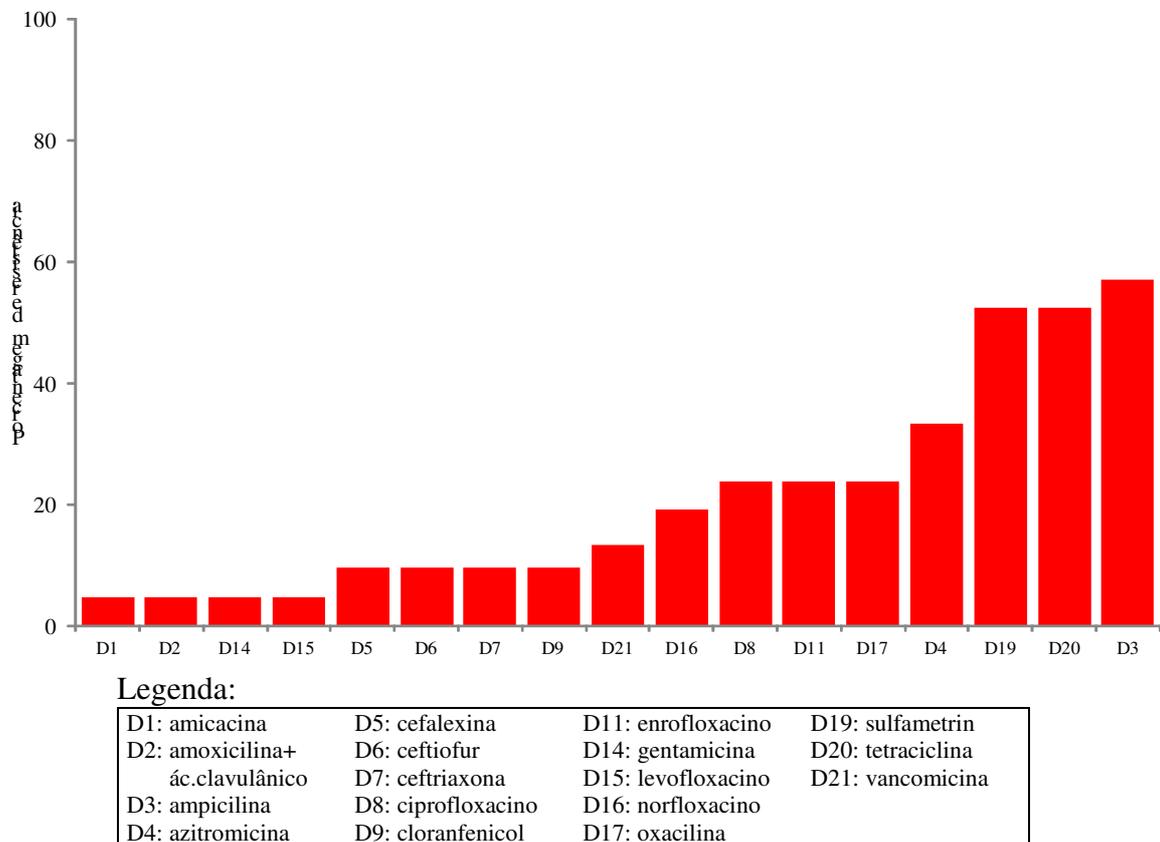


Figura 3. Resistência de *Staphylococcus* spp. frente aos antimicrobianos testados, Botucatu, 2009

A azitromicina também apresentou baixo desempenho frente as bactérias testadas. E essas altas porcentagens significam que está ocorrendo um aumento crescente da resistência a esse antimicrobiano surpreendentemente, pois seu uso em medicina veterinária ainda é pouco difundido.

A ampicilina teve pior desempenho quando comparada a amoxicilina, isso demonstra que não houve resistência cruzada comum entre esses fármacos. A amoxicilina associada ao ácido clavulânico foi mais ativa contra *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.

Foi observado alta resistência bacteriana frente a sulfa, isso está ocorrendo devido a sua ampla utilização durante muitos anos na medicina veterinária, muitas vezes sem critério técnico.

As fluorquinolonas, em especial, o enrofloxacino, tiveram um desempenho abaixo do esperado, o que também pode ser explicado pelo aumento da sua utilização em cães, sendo que muitos profissionais o fazem de forma indiscriminada.

O florfenicol teve pior desempenho em relação ao cloranfenicol no geral, significando que as bactérias além de produzirem as enzimas inativantes, também adquirem plasmídios de resistência para esse antimicrobiano, ao passo que o cloranfenicol apesar de utilizado há 60 anos ainda superou a maioria dos antimicrobianos testados, inclusive os mais modernos como a azitromicina e o levofloxacino.

As cefalosporinas apresentaram-se ativas frente aos micro-organismos testados. Não foi observada uma diferença significativa de desempenho entre as cefalosporinas de primeira e terceira geração, o que demonstra para essa família de antimicrobianos que a descoberta e produção de novas drogas não melhorou praticamente em nada a eficácia terapêutica das mesmas.

A gentamicina é muito ativa frente a enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa* e dificilmente apresenta resistência cruzada com outros antimicrobianos. A resistência bacteriana a esse fármaco é adquirida principalmente pela transferência de fatores R pelo processo de conjugação, que produzem enzimas inativantes e a resistência por mutação é muito rara, o que explica a sua maior efetividade entre todos os antimicrobianos testados (9).

## CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a resistência dos micro-organismos está em ascensão em praticamente todos os antimicrobianos testados, mesmo aqueles ainda sequer utilizados em medicina veterinária como o levofloxacino ou pouco utilizados como a azitromicina e oxacilina.

A resistência encontrada a vancomicina foi surpreendente, visto que é uma das últimas opções terapêuticas contra bactérias multidrogas resistentes e o seu uso na medicina veterinária é proibido. Como não houve administração de vancomicina nos cães, podemos supor que a teoria da transmissão de genes de resistência é possível entre as linhagens de bactérias isoladas de humanos e caninos.

A frequência dessa transmissão ainda não é conhecida. Mas ela existe, significando um problema de saúde pública. Os cães são reservatórios dessas bactérias multidrogas resistentes e podem transmitir por meio de plasmídios os genes de resistência. É provável que o aumento da proximidade com esses animais facilite a transmissão, causando um grave problema de saúde pública.

## REFERÊNCIAS

1. Andrade SP. Manual de terapêutica veterinária. 2ª ed. São Paulo: Rocca; 2002.
2. Oliveira LC, Brilhante RSN, Cunha MAS, Carvalho CBM. Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas. Arq Bras Med Vet Zootec. 2006;58:32-5.
3. Wegener H, Bager F, Arestrup FM. A vigilância da resistência antimicrobiana no homem e nos animais na Europa. Euro Surveill. 1997;2:21-2.
4. Ossiprandi MC, Bottarelli E, Cattabiani F. Susceptibility to vancomycin and other antibiotics of 165 Enterococcus strains isolated from dogs in Italy. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2008;31:1-9.
5. Guardabassi L, Schwarz S, Loyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. J Antimicrob Chemother. 2004;54:321-32.
6. Descheemaeker PRM, Chapelle S, Devriese LA, Butaye P, Vandamme P, Goossens H. Comparison of glycopeptide-resistant Enterococcus faecium isolates and glycopeptides resistance genes of human and animal origins. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:2027-32.

7. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Clinical veterinary microbiology. London: Wolfe; 1994.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resistência microbiana - mecanismos e impacto clínico [Internet]. Brasília; 2008 [acesso em 2009 Nov 16]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo2/laboratorio2.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/laboratorio2.htm)
9. Tavares W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2001.
10. Karaca Y, Coplu N, Gozalan A, Oncul O, Cital BE, Esen B. Clo-trimoxazole and quinolone resistance in Escherichia coli isolated from urinary tract infections over the last 10 years. Int J Antimicrob Agents. 2005;26:75-7.
11. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Microbiologia médica. 21ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
12. Paes AC, Siqueira AK. Perfil de sensibilidade e resistência dos streptococcus spp frente a antimicrobianos de uso veterinário. Rev Bras Med Vet. 2004;26:3.

**Recebido em: 20/11/11**

**Aceito em: 17/10/12**

## 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 Paes de A. N. Pinto
Alice Fernandes Alfieri	Eliana Curvelo	José Paes de Oliveira Filho
Alicio Martins Júnior	Eliana Roxo	José Rafael Modolo
Alda Lúcia Gomes Monteiro	Elizabeth Oliveira da Costa	José Roberto Kfoury Júnior
Altivo José de Castro	Élvio Carlos Moreira	José Roberto Sartori
Alvimar José da Costa	Enrico Lippi Ortolani	José Vasconcelos Lima Oliveira
Amauri Alcindo Alfieri	Evelise Oliveira Telles	Joselito Nunes Costa
Américo G. da Silva Sobrinho	Fabiano Montiani Ferreira	Jovanir I. Müller Fernandes
Ana Carolina B. C. Fonseca Pinto	Felipe Masiero Salvani	Julieta Rodini Engrácia de Moraes
Ana Liz Garcia Alves	Fernanda da Cruz L. e Alvarenga	Júlio César de Freitas
Ana Paula Frederico R. L. Bracarense	Fernando Antônio de Avila	Júlio Lopes Siqueira
Ana Sílvia A. M. T. Moura	Fernando Ferreira	Kátia Denise Saraiva Bresciani
Ana Terezinha Tavechio	Fernando Pandolfo Bortolozzo	Kleber Tomás de Resende
Andrey Pereira Lage	Flávia de Rezende Eugênio	Laerte Ferreiro
Andrigo Barboza de Nardi	Flavio Ruas de Moraes	Lara Borges Keid
Ângelo João Stopiglia	Francisco Carlos Faria Lobato	Leandro Rodello
Annelise de Souza Traldi	Francisco José Teixeira Neto	Leucio Câmara Alves
Antônio Carlos Alessi	Francisco Leydson Formiga Feitosa	Lílian Gregory
Antonio Carlos Cunha Lacreta Júnior	Frederico Ozanam Papa	Lisiane de A. Martins
Antônio Carlos Paes	Geder Paulo Herrmann	Lissandro Gonçalves Conceição
Antonio João Scandolera	Germano Francisco Biondi	Luciana Del Rio Pinoti Carlini
Antônio José de Araújo Aguiar	Gervásio Henrique Bechara	Luciana Morganti Ferreira Maselli
Antonio Nader Filho	Gilson Helio Toniollo	Luciano José da Costa Figueiredo
Antônio Sérgio Ferraudó	Guilherme Jordão Magalhães Rosa	Luís Carlos Vulcano
Antonio Waldir Cunha da Silva	Gustavo Ferrer Carneiro	Luís Gustavo Corbellini
Aparecido Antônio Camacho	Helenice de Lima González	Luiz Alberto do Lago
Aramis Augusto Pinto	Helenice de Souza Spinosa	Luiz Antônio Mathias
Áureo Evangelista Santana	Helio José Montassier	Luiz Augusto do Amaral
Bernardete Miranda dos Santos	Henrique Nunes de Oliveira	Luiz Carlos de Souza
Bruna P. A. da Fonseca	Humberto Tonhati	Luiz Celso Hygino da Cruz
Bruno Watanabe Minto	Idércio Luiz Sinhorini	Luiz Fernando de O. S. Carvalho
Caris Maroni Nunes	Iolanda Aparecida Nunes	Luiz Francisco Prata
Carla Forte Maiolino Molento	Ivan Roque de Barros Filho	Luiz Francisco Zafalon
Carla Lopes de Mendonça	Ivanete Kotait	Luiz Henrique de Araújo Machado
Carlos Alberto de M. Lopes	Ivanete Susin	Luzia Helena Queiroz
Carlos Antônio de Miranda Bomfim	Iveraldo dos Santos Dutra	Magda Alves de Medeiros
Carlos Augusto A. Valadão	Ivo Wentz	Marcelo Bahia Labruna
Carlos Roberto Conti Naumann	Izidoro Francisco Sartor	Marcelo Beltrão Molento
Carlos Roberto Daleck	Jackson Victor de Araújo	Marcelo George Mungai Chacur
Carlos Roberto Teixeira	Jane Megid	Marcelo Meller Alievi
Carolina Madeira Lucci	Jean Carlos Ramos da Silva	Marcelo Resende de Souza
Cassiano Victória	Jean Guilherme F. Joaquim	Marcelo Vasconcelos Meireles
Cecílio Soares Filho	Jener Alexandre S. Zuanon	Márcia C. da Sena Oliveira
Célia Regina Orlandelli Carrer	João Carlos Pinheiro Ferreira	Márcia Marinho
Celso A. Rodrigues	João Guilherme P. Filho	Márcia Marques Jericó
Cezinande de Meira	João Luiz Horácio Faccini	Márcia Valéria Rizzo S. Szabó
Ciniro Costa	João Pessoa Araújo Júnior	Marcia Oliveira Lopes
Cláudia Valéria S. Brandão	João Ricardo Dittrich	Marcílio Dias S. da Mota
Cláudio Dias Timm	José Antônio Marques	Márcio Machado Ladeira
Claudio Scapinello	José Antônio Viana	Marco A. F. Lopes
Daisy Pontes Netto	José Antônio Visintin	Marco Antonio Alvarenga
Daniel Augusto Barroso Lessa	José Augusto B. Afonso	Marco Antonio Gioso
Dante Pazzanese Duarte Lanna	José Carlos de Andrade Moura	Marco Antonio Lemos de Oliveira

Marconi Rodrigues de Farias	Paulo Alberto Lovatto	Ronaldo Lopes Oliveira
Marcos Amaku	Paulo César Ciarlini	Rosana M. O. Clark
Marcos Chalhoub Coelho Lima	Paulo Fernando Machado	Rosângela Zacarias Machado
Marcos Jun Watanabe	Paulo Francisco Domingues	Rosângela Locatelli Dittrich
Marcos Veiga dos Santos	Paulo Henrique Franceschini	Rubens Antônio Carneiro
Margareth Elide Genovez	Paulo Henrique Jorge da Cunha	Samir Issa Samara
Maria Angélica Miglino	Paulo Michel Roehle	Sandra de Moraes Gimenes Bosco
Maria Cecília Rui Luvizotto	Paulo Roberto Brandão	Sandra Mara Araújo Crispim
Maria da Glória Buzinaro	Paulo Roberto de Lima Meirelles	Sebastião de Campos Valadares Filho
Maria de Lourdes R. S. da Cunha	Paulo Roberto Rodrigues Ramos	Sergio Borges Mano
Maria Denise Lopes	Pedro Manuel Leal Germano	Sheila Canavese Rahal
Maria Gisela Laranjeira	Peterson Triches Dornbusch	Silvia M. Nishida
Maria Jaqueline Manprim	Priscilla Anne Melville	Silvia Maria Alves Gomes
Maria Lucia Gomes Lorenço	Raimundo Souza Lopes	Simone Baldini Lucheis
Maria Lúcia Zaidan Dagli	Raphael Lúcio Andreatti Filho	Simone de Carvalho Balian
Maria Luiza Delavechia	Raquel Y. A. Baccarim	Simone Tostes de Oliveira
Maria Madalena Pessoa Guerra	Raul Franzolin Neto	Sonia Regina Pinheiro
Maria Terezinha S. Peraçoli	Raul José Silva Girio	Sony Dimas Bicudo
Márcia Valéria Rizzo S. Szabó	Regina Kiomi Takahira	Stefano Hagen
Maria Verônica de Souza	Renato Campanarut Barnabé	Stélio Pacca Loureiro Luna
Marilena Longo Büll	Renato Cesar Sacchetto Tôrres	Teresa C. G. de O. Siqueira
Marília Martins Melo	Renato Silva de Sousa	Tereza Cristina C. da Silva
Marion Burkhardt de Koivisto	Renée Laufer Amorim	Tilde Rodrigues Froes
Mary Marcondes	Ricardo Augusto Mendonça Vieira	Valéria Marçal Félix de Lima
Mauricio Costa Alves da Silva	Ricardo de Oliveira Orsi	Valéria Nobre L. S. Oliva
Mayra Elena O. D'Avila Assumpção	Ricardo J. Del Carlo	Vamilton Alvares Santarém
Milton Hissashi Yamamura	Roberta Lemos Freire	Vanerli Beloti
Mitika Kuribayashi Hagiwara	Roberto Antonio Rodella	Vania Maria de V. Machado
Mônica Vicky Bahr Arias	Roberto Calderón Gonçalves	Venício José de Andrade
Nei Moreira	Roberto de Oliveira Roça	Vera Lúcia M. Hall
Nelson Carneiro Baião	Roberto Sartori Filho	Victor Cruz Rodrigues
Nelson Moraes	Roberto Soares de Castro	Virgínia Bodelão Richini Pereira
Nereu Carlos Preste	Rodrigo Martins Soares	Wagner dos Reis
Nilson Roberto Benites	Rodrigo Otávio Silveira Silva	Wagner Luis Ferreira
Noeme Sousa Rocha	Rogério de Paula Lana	William Koury Filho
Oswaldo Durival Rossi Junior	Rogério Giufrida	Wilter Ricardo R. Vicente
Pacífico Antônio Diniz Belém	Rogério Martins Amorim	

## 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 espaço 1,5, 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, 1.5 line spacing, beginning with the "RESUMO". Independent of the paper language, the abstract must be submitted in English, Portuguese and Spanish.

- Must include a maximum of five "palavras-chave", keywords, and palabras claves that identify the text content.

**3. The structure of the paper must include:**

**Introduction:** Clearly state the objective of the study with brief overview of the investigated problem and literature review.

**Material and Methods:** Provide a concise description of the experimental methods, variables, population in study, equipment, as well as the statistics, in sufficient detail to allow other researches to reproduce the results.

**Results:** The results should be described without interpretation and comparisons. The results may include **tables**, which should come in a separate sheet (maximum of 5 tables) and numbered consecutively in Arabic numerals, with the title on the top, according to the rules of table presentation by ABNT/WBR 6023/2000 from Associação Brasileira de Normas Técnicas, and identified in the text as Table; **figures**, in case of graphs, photographs, drawings, maps, etc, numbered consecutively in Arabic numerals (maximum of six), cited in the text as Figure. **Photographs** may be black and white or color, identified with the author's name in the back. **Original drawings** must be printed in high quality paper.

**Discussion:** Should be the interpretation of the results, relative to other relevant studies, presented in the introduction. If convenient, the results and discussion may be presented together.

**Conclusions:** The final synthesis, based on the results and discussion.

**References:** Should be presented according to Vancouver rules (<http://www.icmje.org/>), and arranged in alphabetical order, by author's last name (examples in the end of the instructions).

Manuscripts **should** be edited in Microsoft Word for Windows, for text, Excel (any version) for graphs, JPEG or GIF format (images) for photographs, drawings and maps, A4 format paper (21,0 x 29,7 cm), double spaced, leaving at least 2,5 cm margins, (lateral, top and bottom of page), Times New Roman font, size 12 and numbered in Arabic numerals, beginning in the identification page. The authors will have to present numeration in the lines, restarting the counting to each new page. Illustrations and legends must be presented on separate sheets.

Reprints will not be offered. The articles will be available in PDF format at the journal website. The same rules apply for all the other sections of the journal. The manuscripts should not exceed 15 pages. Unusual abbreviations should be used only after first time citation.

## REVIEW ARTICLES

The review articles will be published in Portuguese, English or Spanish, if it provides scientific contribution that is relevant in the area, when invited by the editors. The review articles must include: Title (Portuguese, English and Spanish), resumo with palavras-chave, abstract with key words and resumen with palabras-claves, introduction, subject overview, conclusion e references. Must contain a maximum of 20 pages and 60 references.

## CASE REPORTS

Should not be prepared with the same structure as the articles. The case reports must present the title in Portuguese, English and Spanish, resumo with palavras-chave, abstract with keywords and resumen with palabras claves and references. Must contain a maximum of five pages, three tables or figures and 15 references.

## SHORT COMMUNICATIONS

These are reports with new and relevant data of original studies, as preliminary results of a research. Must be presented with a maximum of five pages, one table and ten references. The structure should follow the same rules for case reports.

## REFERENCES AND CITATIONS

References should be numbered consecutively in order in which they are first mentioned in the text, tables, and legends by Arabic numbers in parentheses in same sequence. The titles of journals should be abbreviated according to the style *List of Journals Indexed in Index Medicus* available from: <http://www.nlm.nih.gov>.

### Examples:

#### *Citations*

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram. O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51). O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

### *References*

List the first six authors followed by et al.

#### **1 Journal article**

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

#### **2 Organization as author**

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

#### **3 Book**

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

#### **4 Chapter in a book**

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2<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 Conference paper**

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3<sup>o</sup> Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

#### **6 Dissertation**

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

#### **7 Electronic material on Internet**

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <<http://www.milkpoint.com.br>>.

## REVISTA “VETERINARIA Y ZOOTECNIA”

### NORMAS PARA PRESENTACIÓN DE TRABAJOS

La Revista **Veterinaria y Zootecnia**, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, publica artículos científicos originales, artículos de revisión de bibliografía, estudios de caso y comunicaciones cortas, relacionadas con las áreas de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, con periodicidad semestral, en las lenguas Portugués, Español o Inglés, siendo los conceptos y opiniones emitidas, de exclusiva responsabilidad de los autores.

La publicación depende de la evaluación preliminar del Presidente del Consejo Editorial, que analiza la relevancia, y los aspectos formales, de acuerdo con la categoría del artículo sometido y las normas editoriales establecidas. Si es aprobado, se adopta el mérito de la evaluación por pares, se envía para dos Revisores, de acuerdo con el área. Los conceptos además de la imparcialidad, serán mantenidos bajo estricta reserva, sin que exista la posibilidad de identificación entre autores y evaluadores. Los artículos no publicados serán devueltos.

Los trabajos deben ser enviados pela página WEB de la revista <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>

**Prof. Helio Langoni**

**Revista “Veterinaria y Zootecnia”**

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

**18618-000 – Dist. Rubião Junior – SP – Brasil**

### INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

#### ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Deben ser estructurados de acuerdo con los siguientes puntos:

**1. Página principal, con:**

- Título del trabajo en portugués, inglés y en español, tipo de letra Times New Roman, número 12, con espacio entre líneas sencillo, en negrilla y centrado, en letra mayúscula. Cuando sea necesario, indicar la entidad que financia la investigación, como primer pié de página;
- Nombres completos de los autores, en los cuales solamente la primera letra de cada nombre debe ser mayúscula, en lado derecho de la página. Digitalarlos separados un por línea, con **notas de pié** de página numeradas y en sobrescrito, **que indicarán** el cargo y la dirección profesional de los autores, seguidos de la institución donde el trabajo fue realizado o en las cuales están vinculados;
- Nombre, dirección, teléfono, fax y correo electrónico para correspondencia.
- En el caso de involucrar seres humanos o animales de experimentación, enviar el concepto de la Comisión de Ética o equivalente, destacando en el trabajo antes de las referencias y fecha de aprobación, así como el envío de la copia del concepto.

**2. Página con resumen en Portugués, Inglés y Español.**

- Tanto el “resumo”, como el “abstract”, así como el resumen, deben estar seguidos del título del trabajo, en el idioma respectivo y contener, como máximo 400 palabras cada uno, con informaciones referentes a la introducción, metodología, resultados y conclusiones. El texto debe estar ajustado (justificado) y digitado en un solo párrafo y a espacio de 1,5 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>>.