

Veterinária e Zootecnia

Vet e Zootec.

2012 setembro; 19(3): 265-427

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
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)

Revisor – Inglês: José Carlos de Figueiredo Pantoja (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 (UFSM/Santa Maria)
Nivaldo da Silva (UFMG – Escola de Veterinária)
Pamela Ruegg (School of Veterinary Medicine/Madison – Wisconsin – USA)
Paulo de Camargo Duarte (Colorado State University – USA)
Paulo Roberto Leme (USP – FZEA – Pirassununga)
Rinaldo Aparecido Mota (UFRPE/Recife)
Roberto Mauricio Carvalho Guedes (UFMG – Escola de Veterinária)
Rogério de Paula Lana (UFV/Viçosa)
Rômulo Cerqueira Leite (UFMG – Escola de Veterinária)
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

EDITORIAL272

ARTIGOS DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE/ARTÍCULOS DE REVISIÓN

O ABATE DE FRANGOS PELO MÉTODO KOSHER: DEFINIÇÕES, CONJUNTURA DE MERCADO E PERSPECTIVAS DE ESTUDO. / THE SLAUGHTER OF CHICKENS BY THE KOSHER METHOD: DEFINITIONS, MARKET SITUATION AND PROSPECTS OF STUDY. / SACRIFICIO DE POLLO MEDIANTE EL MÉTODO KOSHER: DEFINICIONES, MERCADO Y PERSPECTIVAS DE ESTUDIO. Thiago Braga Izidoro, Juliano Gonçalves Pereira, Vanessa Mendonça Soares, Thiago Luiz Belém Spina, José Paes de Almeida Nogueira Pinto.....274

ASPECTOS RELACIONADOS À FORMAÇÃO, FUNÇÃO E REGRESSÃO DOS CORPOS LÚTEOS SUPLEMENTARES EM ÉGUAS. / ASPECTS RELATED TO FORMATION, FUNCTION AND REGRESSION OF SUPPLEMENTARY CORPORA LUTEA IN MARES. / ASPECTOS RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN, FUNCIÓN Y REGRESIÓN DE LOS CUERPOS LÚTEOS SUPLEMENTARIOS EN YEGUAS. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva, José Nicolau Próspero Puoli Filho, Cezinande de Meira283

EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO NO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO. / EFFECTS OF HYPOTHYROIDISM ON MALE REPRODUCTIVE SYSTEM. / EFECTOS DEL HIPOTIROIDISMO EN SISTEMA REPRODUCTIVO MASCULINO. Aline Silva Rocha, Frederico Ozanam Papa294

CONSIDERAÇÕES SOBRE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS. / CONSIDERATIONS OF EMBRYONIC STEM CELLS. / CONSIDERACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS. Aline Silva Rocha, Leandro Maia, Mydian Daroz Guastali, Rodrigo Volpato, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga.....303

RELATOS DE CASO/ CASE REPORTS/ ESTUDIOS DE CASO

HIDRANENCEFALIA EM FETO EQUINO – RELATO DE CASO. / HYDRANENCEPHALY IN EQUINE FETUS - CASE REPORT. / HIDRANENCEFALIA EN EL FETO EQUINO - CASO CLÍNICO. Carolina Nogueira de Moraes, Leandro Maia, Bruna Busianov Zaharov Simon, Luana de Cássia Bicudo, Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva, Isabelle Rayanne Sousa de Oliveira, Cezinande Meira.....314

DERMATOMIOSITE CANINA FAMILIAR- SIMILE: RELATO DE CASO. / CANINE FAMILIAL DERMATOMYOSITIS-SIMILE: CASE REPORT. / DERMATOMIOSITIS CANINA FAMILIAR – SÍMIL: REPORTE DE CASO. Juliana Odagui, Claudio Nazaretian Rossi, Carlos Eduardo Larsson Jr, Nilceo Schweri Michalany, Carlos Eduardo Larsson.....318

COMUNICAÇÃO/ COMMUNICATION/ COMUNICACIÓN

GLIAL CELLS ANEUPLOID FROM CULTURE OF EQUINE NEONATE SPINAL CORD. / ANEUPLOIDIA EM CÉLULAS DA GLIA PROVENIENTES DA CULTURA DE MEDULA ESPINHAL DE EQUINO NEONATO. / ANEUPLOIDÍA EN CÉLULAS DE LA GLIA PROVENIENTES DEL CULTIVO DE LA MÉDULA ESPINAL DE EQUINO NEONATO. Leandro Maia, Ligia Souza Lima de Oliveira da Mota, Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga, Renee Laufer-Amorim, Bruna De Vita, Carolina Nogueira de Moraes, Rogério Martins Amorim322

RISCO DE TRANSMISSÃO DA RAIVA HUMANA PELO CONTATO COM SAGUIS (*Callithrix jacchus*) NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL. / RISK OF RABIES TRANSMISSION BY HUMAN CONTACT WITH MARMOSETS (*Callithrix jacchus*) IN CEARÁ STATE, BRAZIL. / RIESGO DE TRANSMISION DE RABIA HUMANA POR EL CONTACTO CON SAGUIS (*Callithrix jacchus*) EN EL ESTADO DE CEARÁ, BRASIL. Tereza D'ávila de Freitas Aguiar, Rosivaldo Quirino

Bezerra Júnior, Edmara Chaves Costa, Benedito Neilson Rolim, Phyllis Catharina Romijn, Nélio Batista de Morais, Maria Fátima da Silva Teixeira.....326

LOBAÇÃO PULMONAR E DISTRIBUIÇÃO BRÔNQUICA DA JARITATACA (*Conepatus semistriatus*, Boddaert, 1785) - COMUNICAÇÃO CURTA. / LUNG LOBATION AND BRONCHIAL DISTRIBUTION IN THE STRIPED HOG-NOSED SKUNK (*Conepatus semistriatus*, Boddaert, 1785) – SHORT COMMUNICATION. / DISTRIBUCIÓN DE LÓBULOS PULMONARES Y ÁRBOL BRONQUIAL DE LA MOFETA BILISTADA (*Conepatus semistriatus*, Boddaert, 1785) – COMUNICACIÓN CORTA. Matheus Camargos de Britto Rosa, Gabriela Castro Lopes, Carlos Eduardo Oliveira Sestari, Gregório Corrêa Guimarães, Fabrício Singaretti Oliveira332

ARTIGOS/ARTICLES/ARTÍCULOS

CONCENTRAÇÃO PROTEICA NOS FLUIDOS FETAIS COMO MÉTODO INDICADOR DA MATURIDADE RENAL DE FETOS CANINOS. / PROTEIN CONCENTRATION OF FETAL FLUIDS AS AN INDICATOR METHOD OF CANINE RENAL MATURITY. / CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS FLUIDOS FETALES COMO MÉTODO INDICADOR DE LA MADUREZ RENAL EN PERROS. Christiane da Silva Barreto, Nereu Carlos Prestes, Fabiana Ferreira de Souza, Roberta Valeriano dos Santos, Priscilla Mitie Matayoshi, Bruna De Vita, Luciana da Silva Leal.....337

EFEITO DE MEIOS DILUENTES NA VIABILIDADE DE SÊMEN CONGELADO BOVINO. / EFFECT OF DIFFERENT EXTENDERS ON VIABILITY OF BOVINE FROZEN SEMEN. / EFECTO DE DISOLVENTES SOBRE LA VIABILIDAD DE SEMEN DE BOVINO CONGELADO. Marcelo George Mungai Chacur, Huberson Sanches Dias, Frederico Ozanam Papa, Bruno Alves Louvison, Mayra Micarelli Calesco, Patrícia de Mello Papa.....346

QUALIDADE ÓSSEA DE POEDEIRAS COMERCIAIS LEVES ALIMENTADAS COM RAÇÕES SUPLEMENTADAS COM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS. / BONE QUALITY OF LAYING HENS FED DIETS SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT VEGETABLE OILS. / CALIDAD ÓSEA DE PONEDORAS COMERCIALES ALIMENTADAS CON PIENSOS ADICIONADOS CON DIFERENTES ACEITES VEGETALES. Ana Beatriz Garcia Faltarone, Edivaldo Antonio Garcia, Silvana Martinez Baraldi Artoni, Sarah Sgavioli, Maeli Dal Pai Silva, Heraldo César Gonçalves, Kleber Pelícia356

AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE CORTISOL E PROGESTERONA EM VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*) SUBMETIDAS A MANEJO DIÁRIO OU MANEJO SEMANAL. / PLASMA CONCENTRATION OF PROGESTERONE AND CORTISOL IN NELORE COWS (*Bos taurus indicus*) SUBMITTED TO DAILY OR WEEKLY HANDLING. / EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CORTISOL Y PROGESTERONA EN VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*) SOMETIDAS A CONDICIONES DE MANEJO DIARIO O SEMANAL. Rosiára Rosária Dias Maziero, Ian Martin, Maria Clara Costa Mattos, João Carlos Pinheiro Ferreira.....366

DETECÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis EM OVOS DE CODORNAS JAPONESAS (*Coturnix coturnix japonica* - TEMMINCK E SCHLEGEL, 1849) SUBMETIDAS A ESTRESSE CÍCLICO PELO CALOR*. / DETECTION OF *Salmonella* Enteritidis IN EGGS OF JAPANESE QUAIL (*Coturnix coturnix japonica* - TEMMINCK E SCHLEGEL, 1849) SUBMITTED TO CYCLIC HEAT STRESS. / DETECCIÓN DE *Salmonella* Enteritidis EN HUEVOS DE CODORNIZ JAPONESA (*Coturnix coturnix japonica* - TEMMINCK E SCHLEGEL, 1849) SOMETIDAS A ESTRÉS CÍCLICO POR CALOR. Edson Ryuiti Katayama, Taís Cremasco Donato, Francine Vercese, Edivaldo Antonio Garcia, Adriano Sakai Okamoto, Raphael Lucio Andreatti Filho373

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE COLETA E COLORAÇÃO PARA CITOLOGIA CONJUNTIVAL EM CÃES NORMAIS. / COMPARATIVE STUDY OF METHODS OF HARVESTING AND STAINING FOR CONJUNCTIVAL CYTOLOGY IN NORMAL DOGS. / ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE COLECTA Y TINCIÓN DURANTE LA CITOLOGÍA CONJUNTIVAL EN LOS PERROS NORMALES. Renata Fuentes Borges, Karym Christine de Freitas Cardoso, Aline Adriana Bolzan, Cláudia Momo, Cristiane dos Santos Honsho.....381

- EFICIÊNCIA DO ACETATO DE DESLORELINA E DO EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM ÉGUAS. / EFFICIENCY OF THE DESLORELIN ACETATE AND EQUINE PITUITARY EXTRACT ON INDUCTION OF OVULATION IN MARES. / LA EFICIENCIA DEL ACETATO DE DESLORELINA Y EL EXTRACTO DE PITUITARIA EQUINA EN LA INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN EN YEGUAS.** Cely Marini Melo, Frederico Ozanam Papa, José Nicolau P. Puoli Filho, Gustavo Henrique Araújo, José Antônio Dell'Aqua Jr, Marco Antonio Alvarenga392
- UTILIZAÇÃO DO AGLEPRISTONE NO TRATAMENTO DA HIPERPLASIA FIBROEPITELIAL MAMÁRIA FELINA. / USE OF AGLEPRISTONE IN THE TREATMENT OF FELINE MAMMARY FIBROEPITHELIAL HYPERPLASIA. / USO DE AGLEPRISTONA EN EL TRATAMIENTO DE HIPERPLASIA FIBROEPITELIAL MAMARIA FELINA.** Francis Brito da Silva, Alessandra Estrela da Silva Lima, Lorena Gabriela Rocha Ribeiro, João Moreira da Costa Neto, Ana Carolina Farias Costa, Camila Pinho Balthazar da Silveira, Stella Barrouin Mello, Daniela Farias Laranjeira, Arianne Pontes Oriá399
- EXAME ULTRASSONOGRÁFICO DA ARTICULAÇÃO METACARPOFALANGEANA DE EQUINOS PRATICANTES DE POLO NA ZONA OESTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO: PROTOCOLO E MENSURAÇÕES. / ULTRASONOGRAPHY OF THE METACARPOPHALANGEAL JOINT OF POLO HORSES OF THE WEST OF THE STATE OF RIO DE JANEIRO: SCANING PROTOCOL AND MEASUREMENTS. / ECOGRAFÍA DE LA ARTICULACIÓN METACARPOFALÁNGICA DE CABALLOS DE POLO EN EL OESTE DEL ESTADO DE RIO DE JANEIRO: PROTOCOLO Y MEDIDAS.** Kate Moura da Costa Barcelos, Anna Paula Balesdent Barreira, Fabiana Batalha Knackfuss, Gabriela de Vasconcelos Costa Lobato, Tatiana Noronha Gonçalves Rodrigues, Márcia Carolina Salomão Santos, Daniel Augusto Barroso Lessa.....407

EDITORIAL

SUSTENTABILIDADE: UMA PREOCUPAÇÃO MUNDIAL

Sustentabilidade é a palavra chave do momento, nas cadeias produtivas de qualquer alimento, ou atividade agropecuária. É preciso reparar erros do passado e tentar melhorar a qualidade de vida do ser humano, cuidando melhor do nosso planeta. Evitar abusos deve ser o consenso, e hoje já se fala em Planeta Saudável, visando ações relacionadas à preservação do meio ambiente.

A incorporação dos princípios sustentáveis, é uma realidade no dia-a-dia das pessoas e agenda de muitas organizações. Na agricultura familiar se observa o investimento em alternativas para o modelo de produção convencional, utilizando-se tecnologias simples e viáveis de produção, capazes de gerar o mínimo de impacto ao meio ambiente.

Estimativas apontam que, em 2050, a população mundial poderá atingir 10 bilhões de habitantes e para atender uma crescente demanda por alimentos, há necessidade de um modelo de agricultura familiar capaz de produzi-los de forma efetiva e com qualidade, sem agredir o meio ambiente ou comprometer os recursos naturais finitos. Será necessário que a partir de uma visão mais moderna, espírito empreendedor e inteligência na gestão dos recursos naturais, a juventude do campo transforme a realidade das pequenas propriedades e das comunidades em que residem.

Neste sentido a área de Ciências Agrárias, onde a Medicina Veterinária se insere, deverá se preocupar com o tratado de Malthus, que estabelece que a produção de alimentos cresce em progressão aritmética e a população cresce em progressão geométrica. Valendo-se deste conceito temos que pensar na produção de alimentos como um todo, incluindo-se os produtos de origem vegetal e animal que além da quantidade deve priorizar também a qualidade, especialmente os de origem animal que devem ser livres de agentes causadores de diferentes zoonoses. Este tema é intrigante e importante pois é a vida do planeta e do homem que estão em jogo. Temos que apelar para a consciência ambiental e reforçar que a utilização de boas práticas torna a agricultura familiar um dos principais pilares da sustentabilidade no meio rural brasileiro.

Este volume da “Veterinária e Zootecnia” traz quatro artigos de revisão: O abate de frangos pelo método kosher: definições, conjuntura de mercado e perspectivas de estudo; Aspectos relacionados à formação, função e regressão dos corpos lúteos suplementares em éguas; Efeitos do hipotireoidismo no sistema reprodutor masculino; e Considerações sobre células-tronco embrionárias. Traz também dois relatos de caso: Hidranencefalia em feto equino – relato de caso; e Dermatiosite canina familiar- símile: relato de caso. Traz ainda três comunicações curtas: Glial cells aneuploid from culture of equine neonate spinal cord; Risco de transmissão da raiva humana pelo contato com saguis (*Callithrix jacchus*) no estado do Ceará, Brasil; e Lobação pulmonar e distribuição brônquica da jaritataca (*Conepatus semistriatus*, Boddaert, 1785) - comunicação curta. E nove artigos originais: Concentração proteica nos fluidos fetais como método indicador da maturidade renal de fetos caninos; Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino; Qualidade óssea de poedeiras comerciais leves alimentadas com rações suplementadas com diferentes óleos vegetais; Avaliação das concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas nelore (*Bos taurus indicus*) submetidas a manejo diário ou manejo semanal; Detecção de *Salmonella*

enteritidis em ovos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica* - Temminck e Schlegel, 1849) submetidas a estresse cíclico pelo calor; Estudo comparativo de métodos de coleta e coloração para citologia conjuntival em cães normais; Eficiência do acetato de deslorelina e do extrato de pituitária equina na indução da ovulação em éguas; Utilização do aglepristone no tratamento da hiperplasia fibroepitelial mamária felina; e Exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana de equinos praticantes de polo na zona oeste do estado do Rio de Janeiro: protocolo e mensurações.

Aproveitando este editorial divulgamos o V Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite do Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite – CBQL, a ser realizado no período de 10 a 12 de Junho de 2013, no Hotel Majestic em Águas de Lindóia-SP, com o tema central: “Qualidade do leite: Responsabilidade de todos!”. A organização está a cargo da diretoria do CBQL. Haverá apresentação de resumos expandidos de trabalhos científicos das áreas de matite e qualidade do leite, que serão publicados em suplemento desta Revista.

Prof. Helio Langoni
Editor-Chefe

O ABATE DE FRANGOS PELO MÉTODO *KOSHER*: DEFINIÇÕES, CONJUNTURA DE MERCADO E PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Thiago Braga Izidoro¹
Juliano Gonçalves Pereira²
Vanessa Mendonça Soares³
Thiago Luiz Belém Spina⁴
José Paes de Almeida Nogueira Pinto⁵

RESUMO

Entende-se por alimento *Kosher* aquele apropriado a um judeu, garantindo sua saúde física e espiritual. Tais alimentos seguem uma série de normas contidas na *Halacha*, que é um conjunto de leis que regem a conduta moral adequada da cultura judaica. Atualmente o mercado de alimentos *Kosher* movimentava cerca de 200 bilhões de dólares nos EUA, tendo como público consumidor não apenas judeus, mas também muçulmanos, vegetarianos e pessoas que associam tais produtos a um controle de qualidade mais rigoroso. Para que um alimento se torne *Kosher*, na prática, ocorre alteração do respectivo fluxograma de produção, sendo o abate de frangos um dos mais modificados em relação ao método convencional. Diante da relevância do assunto, novas linhas de pesquisa emergiram com o intuito de diagnosticar como a inserção ou alteração de etapas no fluxograma industrial de alimentos *Kosher* influenciam a qualidade geral e a inocuidade dos alimentos.

Palavras-chave: abate de frangos, *Kosher*, indústria alimentícia, salga.

THE SLAUGHTER OF CHICKENS BY THE KOSHER METHOD: DEFINITIONS, MARKET SITUATION AND PROSPECTS OF STUDY

ABSTRACT

Kosher food is understood as being the appropriate one for a Jew, ensuring this way their physical and spiritual health. It follows a series of food standards contained in the Halakha, which is a set of laws governing the proper moral conduct of the Jewish culture. Currently the market for Kosher food moves about 200 billion dollars in the USA, with consumers not only among Jews, but also among Muslims, vegetarians and people who associate such products with a more rigorous quality control. To be considered Kosher, a product has to go through some changes in its production flowchart, being the slaughter of chickens one of the most modified compared to the conventional method. Given the importance of the subject, new lines of research have emerged in order to determinate how the insertion or the alteration in the flowchart steps practiced in the Kosher food industry influence the food overall quality and safety.

Keywords: chicken slaughter, Kosher, food industry, food salting process.

¹ Médico Veterinário - Doutor – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu

² Médico Veterinário - Mestrando – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu

³ Médica Veterinária - Doutoranda – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu

⁴ Médico Veterinário - Residente – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu

⁵ Médico Veterinário - Docente da disciplina de Inspeção Sanitária de Alimentos, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu

SACRIFICIO DE POLLO MEDIANTE EL MÉTODO KOSHER: DEFINICIONES, MERCADO Y PERSPECTIVAS DE ESTUDIO

RESUMEN

Se entiende por alimento Kosher a aquel que es considerado más apropiado por un judío, garantizando su salud física y espiritual. Tales alimentos siguen una serie de leyes estipuladas en el Halajá, el cual es un conjunto de estatutos que gobierna la conducta moral apropiada en la cultura judía. Actualmente el mercado para comida Kosher mueve alrededor de 200 mil millones de dólares en los Estados Unidos de América siendo los consumidores no solamente judíos, sino también musulmanes, vegetarianos y personas que asocian tales productos a un control de calidad más riguroso. Para ser considerado Kosher, un producto tiene que pasar por algunos cambios en su diagrama de flujo. Entre estos, uno de los más importantes con relación al método convencional es el sacrificio de pollo. Dada la importancia del tema, han surgido nuevas líneas de investigación con el fin de determinar como la inserción o la alteración en las etapas del diagrama de flujo industrial para alimentos Kosher influye en la seguridad y calidad de estos alimentos en general.

Palabras clave: Kosher, industria de alimentos, sacrificio de pollos, salazón de alimentos.

INTRODUÇÃO

Mesmo possuindo definições distintas, poucos conceitos são tão entrelaçados como Cultura e Religião. Pode-se supor que a religião seja uma manifestação cultural da espiritualidade, ou seja, apenas mais um entre tantos elementos inseridos na cultura. Mas por outro lado, é a religião que molda os hábitos e as manifestações culturais: o modo de se vestir, as relações interpessoais, as noções de abstração e finalmente a alimentação de um povo.

No caso da cultura judaica, a conduta moral é direcionada por um conjunto de leis denominado *Halacha*, sendo esta derivada do livro bíblico Levítico. Contidas na *Halacha* estão diversas normas, que têm como intuito descrever o que seria a alimentação adequada de um judeu, compondo assim o *Kashruth*. De modo bastante abrangente, define-se como alimento *Kosher* aquele que é apropriado a um judeu, garantindo sua saúde física e espiritual.

Nesse ponto são cabíveis os seguintes questionamentos:

- “O que torna um alimento *Kosher*?”
- “Quais as diferenças entre um alimento comum e um considerado *Kosher*?”

Em princípio, estas questões seriam restritas a filósofos, sociólogos ou antropologistas. Nota-se, entretanto, que a vertiginosa expansão do mercado *Kosher*, que nos dias atuais movimentava quase 200 bilhões de dólares nos EUA, fez com que o assunto atingisse outro patamar.

Os processos que constituem a kosherização dos diversos gêneros alimentícios são complexos. Em termos práticos, o que ocorre é a alteração de diversos fluxogramas de produção, sendo o abate de frangos talvez o mais modificado em relação ao método convencional, não-*Kosher*.

A revisão a seguir, tem como objetivo abordar alguns dos temas delineados. Primeiramente, descreve conceitos e diretrizes que tangem à alimentação *Kosher*. A seguir traz um dimensionamento do mercado, ressaltando a relevância do assunto. Finalmente, relata a emergência de linhas de pesquisa que têm buscado estabelecer como a inserção, ou alteração de etapas no fluxograma industrial de alimentos *Kosher* (no caso do presente trabalho, de frangos *Kosher*) influenciam a qualidade geral e a inocuidade dos alimentos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 O alimento *Kosher*

Para Regenstein e Chaudry (1) a palavra *Kosher* ou *Kasher* possui três significados distintos que se interrelacionam:

- Semanticamente, traduz-se como correto ou adequado.
- Não obstante, o vocábulo *Kosher* também pode ter um sentido substantivado, neste caso, *Kosher* é o nome pelo qual se denomina um tipo de sal específico, que é utilizado em fluxogramas industriais da produção de diversos tipos de carne destinados à população judaica.
- Finalmente, há ainda um sentido mais genérico, que se expressa quando o termo *Kosher* é empregado como um adjetivo, qualificando qualquer tipo de alimento que tenha sido produzido ou preparado segundo as tradições e regras judaicas descritas na Halacha.
- Regenstein et al. (2) descrevem algumas diretrizes (e justificativas), originadas das Escrituras, a respeito do que é proibido na alimentação judaica:
- Ingestão de carne de porco.

Esta é uma proibição desprovida de grande embasamento científico. Selby (3) ao realizar sua pesquisa, obteve com rabinos a explicação de que a carne de porco seria um importante modo de transmissão para triquinelose. Embora a asseveração seja válida, questiona-se que todos os alimentos são potenciais transmissores de doenças, algumas mais patogênicas do que a triquinelose.

- Ingestão de sangue animal.

O sangue animal é considerado a própria essência do ser vivo, sendo impróprio e impuro para alimentação.

- Ingestão de carne de alguns animais silvestres.

É uma diretriz bastante dúbia. Estruturiformes como o avestruz são proibidos segundo esta norma, mas hoje já existe a criação comercial deste tipo de animal, mas, no entanto, o consumo de sua carne continua proibido.

- Ingestão de insetos.

A proibição de alimentar-se por insetos pode parecer óbvia em países ocidentais, mas ressalta-se que este é um hábito relativamente comum em países do Sahel e do extremo Oriente. A origem desta regra parece estar no fato de que a presença de um inseto no alimento pode implicar que seu preparo tenha sido executado em condições higiênicas inadequadas.

- Misturar um alimento cárneo com um laticínio.

É uma lei derivada a partir de uma interpretação de um trecho da Torá, que determina: “*Tu não cozerás o filho no leite de sua mãe*”.

O tema da alimentação *Kosher*, por sua complexidade (já que envolve assuntos tão destoantes) e dificuldade de entendimento (inclusive em se traduzir termos absolutamente específicos do hebraico), permaneceu restrito e pouco divulgado por muito tempo. Este panorama mudou consideravelmente nas últimas três décadas.

2 A expansão do mercado *Kosher*

Fore (4) traçou um diagnóstico a respeito do mercado de alimentos *Kosher*. O título do artigo “*Response of the food industry to the minority demands*” é bastante elucidador, no que diz respeito às perspectivas dos pesquisadores sobre as possibilidades de expansão das atividades industriais e comerciais que envolviam os alimentos *Kosher*.

Para este autor (4), todo o processamento *Kosher* era bastante interessante e poderia dar origem a experimentos promissores, entretanto o fato de ser um alimento consumido exclusivamente por uma minoria e ser produzido por empresas pequenas e subindustriais (o

autor utilizou a terminologia “empresas manufatureiras”) seria um entrave para que cientistas considerassem este, um assunto relevante.

Mas este cenário alterou-se bruscamente a partir de meados dos anos 80. No Quadro 1, estão expressos dados que demonstram a expansão vertiginosa do mercado de alimentos *Kosher* nos EUA.

Quadro 1. Expansão do mercado *Kosher* nos EUA

| | 1993 | 1996 | 2000 | 2008-2010 |
|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Oferta de produtos | 10.000 Selby (3) | 40.000 Selby (3) | 75.000 Regenstein et al. (2) | 400.000 Safran e Brenner (5) |
| Lucro das empresas | | 3 \$bi Selby (3) | 7 \$bi Regenstein et al. (2) | 12,5 \$bi Koshermap (6) |
| Tamanho do mercado | 2 \$bi Selby (3) | 32\$ bi Selby (3) | 165 \$bi Regenstein et al. (2) | 200 \$bi Koshermap (6) |

Em qualquer uma das linhas analisadas do Quadro 1, está nítido um crescimento raramente observado em qualquer atividade econômica. Prova disto é que, atualmente, as maiores empresas *Kosher* no mundo são comandadas por não judeus, denotando que o tema não é mais de interesse apenas de uma minoria (3).

Abaixo estão listados, alguns fatores responsáveis por esta ascensão:

- A diversificação de produtos alimentícios disponíveis nos supermercados (Quadro 1), naturalmente possibilitou que um maior número de consumidores se interessasse pelos alimentos *Kosher*.
- Outro fato bastante representativo é que o mercado de alimentos *Kosher* não foi impulsionado pela população judaica, como seria óbvio supor. Nos dias atuais, algo em torno de 20% dos consumidores destes produtos são judeus, os outros 80% são compostos por muçumanos (os princípios Halal são bem similares), vegetarianos, veganos e pessoas com intolerância à lactose (em busca de produtos cárneos garantidamente sem resíduos lácteos) (2).
- O marketing intenso de algumas empresas vinculou em parte da população laica a ideia de que a certificação *Kosher* garante um alimento natural, puro (3).
- Outro fator considerável para tal crescimento reside na sequência operacional dos abates que produzem carnes *Kosher*. Além da inspeção sanitária, obrigatória em qualquer estabelecimento frigorífico, o *abate judeu* possui uma fiscalização extra realizada por um *Bodek*, uma espécie de fiscal sanitário com o intuito de garantir que o abate esteja ocorrendo conforme os preceitos religiosos do *Kashruth*. Entretanto, Regenstein e Chaudry (1) reportam que a figura do *Bodek* para a população laica transcendeu a esfera religiosa e que, sua presença nas plantas frigoríficas implicaria uma maior garantia da inocuidade das carnes *Kosher*.

Não é apenas a presença de um *Bodek* que diferencia um fluxograma de abate *Kosher*, quando comparado a um abate convencional. No caso do abate de frangos, por exemplo, etapas cruciais são alteradas, incluídas, ou excluídas com o intuito de adequar o alimento que será produzido às regras e padrões da alimentação judaica.

3 O abate de frangos pelo método *Kosher*

3.1 Criação e degola

As descrições abaixo foram extraídas de Regenstein e Chaudry (1).

As diferenças entre o abate de frangos pelo método *Kosher* e o convencional iniciam-se ainda na cadeia primária. Existe uma rigorosa fiscalização, por parte de agências certificadoras de produtos *Kosher*, no que tange a alimentação, medicação dos plantéis e condições humanitárias de criação.

O *Koshruth* não permite a insensibilização prévia dos frangos e, deste modo, o abate propriamente dito ocorre por degola direta, ou *Shechita* (corte único e profundo nas jugulares e carótidas). Este procedimento é realizado por um tipo de especialista, denominado *Shochet*, que para a degola utiliza uma faca própria extremamente afiada chamada *Chalaf*.

São intermináveis as discussões sobre o bem-estar de animais submetidos a este tipo de sacrifício. Gentle e Tilston (7) criticam o abate *Kosher*, apontando como um contrassenso o fato de rabinos (estudiosos da *Halacha*) preconizarem o método como sendo o mais humanitário possível.

Por outro lado, Barnnet et al. (8) reportaram que o menor volume de frangos, característica dos processos *Kosher*, bem como a morte imediata dos animais após a degola compensariam a ausência de insensibilização prévia, sendo a *Shechita* considerada aceitável do ponto de vista do bem-estar animal.

3.2 Ausência de escaldagem

Seguindo a sequência de operações, os frangos são pendurados, percorrem uma calha de sangria e seguem direto para a depenagem. Nota-se que neste ponto, há outra diferença considerável em relação ao fluxograma convencional. No abate *Kosher*, não existe escaldagem (tanque de escaldagem a 58°C), embora seja comum na literatura encontrar uma etapa de escaldagem fria, substituindo o processo em água quente que normalmente ocorre nos abates de frango (9). A cultura judaica entende que acima de 20°C a carne está sendo cozida, o que não é permitido.

De modo contrário, tanto a ausência de escaldagem quanto a escaldagem fria, tornam o processo de depenagem automática quase que inviável, sendo necessários trabalhadores para completar o processo manualmente. Por consequência, o abate *Kosher* é mais lento, assim como, é comum as carcaças apresentarem *rasgos* ou *fissuras*, o que pode facilitar a interiorização de bactérias para a carne.

3.3 Linhas de inspeção

O frango *Kosher* é então inspecionado convencionalmente, seguindo as linhas determinadas pela legislação brasileira (10): Linha A – Exame interno das carcaças, Linha B – Exame das vísceras e Linha C – Exame externo.

Um *Bodek* está presente neste momento, no qual é dada atenção especial a adesões nos pulmões das aves (apesar destes órgãos serem fixos nos espaços intercostais) e hematomas nas porções musculares (os quais os *fiscais judeus* denominam genericamente de *problemas de nervos*), sendo descartadas aquelas carcaças que apresentarem qualquer uma das anormalidades citadas, além de outras patologias descritas pelos regulamentos técnicos nacionais.

Além disso, são feitos cortes extras nas pontas das asas das carcaças e no pescoço, com o objetivo de aumentar a absorção de sal.

3.4 A salga

As carcaças saem das linhas de inspeção e são direcionadas aos tanques de pré-resfriamento denominados *chiller*. Após o *chiller*, ocorre o procedimento mais peculiar e característico do abate de frangos pelo método *Kosher*, que é a etapa de salga.

A salga é realizada utilizando-se um sal específico também denominado *Kosher*.

O sal *Kosher* é mais grosso que o sal comercial e durante uma hora as carcaças que saíram do tanque de pré-resfriamento são acondicionadas em caixas contendo este sal, de

modo que o mesmo entre em contato tanto com a parte externa, como a porção interna da ave abatida.

Depois da salga, as carcaças são submersas em baldes, ou tanques contendo água gelada com o intuito de se realizar um processo de dessalga.

Ressalta-se que todas as diferenças descritas no abate *Kosher* (degola direta, ausência de escaldagem, cortes extras na linha de inspeção e salga) têm como objetivo a eliminação total, bem como a não coagulação do sangue do animal sacrificado. Isso porque, como já descrito, o sangue de um animal não pode ser ingerido, por conferir *impurezas espirituais* ao ser humano.

É preciso destacar, que como a legislação brasileira não descreve absolutamente nada a respeito da salga e dessalga de frangos, estas duas etapas não possuem padronizações no que diz respeito a tempo, temperatura e modo de execução, gerando algumas complicações para a ação de fiscalização sanitária.

O fluxograma de abate de frangos *Kosher* encerra-se como o convencional. Saindo da dessalga, as carcaças vão para o gotejamento e por seguinte para a sala de cortes e embalagem.

De todas as informações apresentadas, pode ser aferida a seguinte ideia:

- *O abate de frangos Kosher é menos tecnificado, mais rústico, a ave é manipulada mais vezes.*

Assim, apenas seguindo o raciocínio, conclui-se que o abate *Kosher* geraria alimentos mais contaminados, ou seja, de qualidade microbiológica inferior.

Interessantemente, a literatura científica tem apontado para uma situação diametralmente oposta.

4 Linhas e perspectivas de pesquisa

Os poucos artigos encontrados sobre frangos *Kosher* seguem, basicamente três linhas de pesquisa: A tenderização e aceitabilidade da carne, a quantidade de cloreto de sódio residual e a influência das diferentes etapas do fluxograma *Kosher* sobre a qualidade microbiológica do alimento.

A carne de frango *Kosher* é mais macia e saborosa. A explicação para este fato, provavelmente encontra-se na escaldagem *Kosher* e na quantidade de cloreto de sódio residual ao processo. Powers e Mast (9) e Mast e Macneil (11) sugerem que a escaldagem a 58°C, realizada nos abates convencionais, poderia retirar a camada de gordura superficial das carnes de frango, tornando-as mais duras e conseqüentemente menos palatáveis.

Os mesmo autores, assim como Dukes e Janky (12) apontam que a maior quantidade de sal nas carcaças proporcionaria um efeito de marinação, tornando-a mais saborosa.

Já a respeito da quantidade de cloreto de sódio residual, embora a literatura convirja para a maior quantidade presente nos frangos *Kosher*, a não padronização do processo (já mencionada) torna os resultados muito destoantes. Angel e Weinberg (13) ainda questionam se o escore de sal residual é suficiente para alterar propriedades coligativas da carne, como é o caso da retenção de água.

Os estudos também apontam, unanimemente, para a menor quantidade de bactérias e, conseqüentemente, melhor qualidade microbiológica da carne de frango *Kosher* (9, 11, 14). Mas um detalhe precisa ser destacado. Nenhum dos artigos consultados reporta dados *in loco*, ou seja, são experimentos que mimetizaram em laboratório um ambiente frigorífico, inclusive com culturas de bactérias inoculadas.

No Brasil, os primeiros dados reportados sobre a qualidade microbiológica de frangos abatidos pelo método *Kosher* foram produzidos por um grupo de pesquisa pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP, Campus de Botucatu), com o auxílio de integrantes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Neste caso, o método de trabalho e aferição dos dados foram opostos ao que se verifica na literatura internacional. Não houve experimentação laboratorial, tendo sido trabalhados cientificamente dados oficiais, pertencentes a um estabelecimento industrial.

A qualidade microbiológica observada nos frangos *Kosher* pode ser considerada surpreendente. Compilando dados dos últimos dois anos, não foi verificada qualquer irregularidade (entende-se por isto discordância com a legislação vigente) nas contagens de mesófilos aeróbios, coliformes a 35°C e *Escherichia coli* (15, 16).

Sobre a pesquisa de patógenos as contagens de bactérias do gênero *Staphylococcus* foram consideravelmente baixas, sendo este um resultado inesperado, pois *Staphylococcus* constituem parte da microbiota natural das mãos dos seres humanos e como se nota, o abate *Kosher* é menos tecnicado, ou seja, a ave é mais vezes manipulada quando comparada ao abate convencional (17).

Mesmo a respeito de *Salmonella*, considerado por Mead et al. (18) como o gênero bacteriano mais associado à cadeia produtiva avícola, não registrou-se nenhum isolamento em quase dois anos de análise (19).

5 Perspectivas

Questionamentos relevantes a respeito da qualidade microbiológica de frangos abatidos pelo método *Kosher* persistem:

- Qual seria a pontual influência da etapa de salga/dessalga?
- A quantidade de sal residual é suficiente para eliminar células bacterianas?
- Dados *in loco* comprovarão a qualidade microbiológica dos frangos *Kosher*?
- Os promissores dados nacionais eram o reflexo da kosherização do abate ou simplesmente decorrentes do cumprimento rigoroso dos procedimentos de higiene e sanitização descritos da legislação brasileira? (20).
- Poderia a salga ser expandida para o abate convencional como forma de agregar inocuidade aos alimentos?

Diante de um mercado que movimentava 200 bilhões de dólares/ano, diferentemente do que Fore (4) previu, ainda nos anos 60, estas são perguntas que pertencem a linhas de pesquisas promissoras e carecem de respostas urgentes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efeito microbiológico da etapa de salga, bem como a influência de etapas e procedimentos específicos do fluxograma de abate de aves pelo método *Kosher* carece de imediatos estudos analíticos, de modo a se reduzir o contrassenso entre a importância e tamanho do mercado *Kosher* e o número de publicações científicas disponíveis sobre o tema.

REFERÊNCIAS

1. Regenstein JM, Chaudry M. A brief introduction to some of the practical aspects of the kosher and halal laws for the poultry industry. In: Sams AR. Poultry meat processing. Boca Raton: CRC Express; 2001. p. 281-300.
2. Regenstein JM, Chaudry M, Regenstein CE. The kosher and halal food laws. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2003;2:111-27.
3. Selby JJ. The booming kosher food market [tese]. Indiana: Ball State University; 1997.
4. Fore H. Response of the food industry to minority. Proc Nutr Soc. 1967;26:222-9.

5. Safran E, Brenner BS. Bringing the boom for business e consistent quality to consumers. Broadway, New York; 2011 [cited 2012 Mar 02] Available from: <<http://www.oukosher.org/>>.
6. Koshermap. Mercado de Kasher é destaque na mídia: Revista Veja publica artigo especial sobre mercado Kasher. 2011 [cited 2012 Mar 02] Available from: <http://www.koshermap.com.br/>.
7. Gentle MJ, Tilston VL. Nociceptors in the legs of poultry: implications for potential pain in pre-slaughter sackling. *Anim Welf.* 2000;9:227-36.
8. Barnnet JL, Cronin GM, Scott PC. Behavioural responses of poultry during kosher slaughter and their implications for the birds' welfare. *Vet Rec.* 2007;160:45-9.
9. Powers JM, Mast MG. Quality differences in simulated kosher and conventionally processed chicken. *J Food Sci.* 1980;45:760-4.
10. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves. *Diário Oficial da União, Brasília (DF),* 1998 Nov 26. Sec I. p. 226.
11. Mast MG, Macneil JH. Effect of kosher vs conventional processing on yield quality, and acceptability of broiler chicken. *J Food Sci.* 1983;48:1013-5.
12. Dukes MG, Janky DM. Physical characteristics of pectoralis superficialis from broiler carcasses chilled in either water or sodium chloride solutions under commercial conditions. *J Food Sci.* 1984;49:849-52.
13. Angel S, Weinberg ZG. Variation in salt content of broiler parts from different kosher dressing plants in Israel. *Poult Sci.* 1986;65:481-4.
14. Oscar TP. Persistence of Salmonella serotypes on chicken skin after exposure to kosher salt and rising. *J Food Saf.* 2008;28:388-99.
15. Pereira JG, Spina TLB, Izidoro TB, Machado GP, Silva BF, Souza Junior LCT, et al. Abate Kosher: Estudos descritivo dos microrganismos indicadores em carcaças de frango. In: *Anais do 3º Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária; 2009. Bonito. Bonito: Associação Brasileira de Saúde Pública Veterinária; 2009.*
16. Pereira JG, Spina TLB, Izidoro TB, Machado GP, Silva BF, Souza Junior LCT, et al. Qualidade higiênico sanitária do abate Kosher: pesquisa de microrganismos indicadores em cortes de frango. In: *Anais do 3º Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária; 2009. Bonito. Bonito: Associação Brasileira de Saúde Pública Veterinária; 2009.*
17. Spina TLB, Pereira JG, Izidoro TB, Machado GP, Silva BF, Souza Junior LCT, et al. Salmonella spp. e Staphylococcus coagulase positiva em cortes congelados de frangos abatidos pelo método Kosher. In: *Anais do 3º Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária; 2009. Bonito. Bonito: Associação Brasileira de Saúde Pública Veterinária; 2009.*

18. Mead G, Lammerding AM, Cox N, Doyle MP, Humbert F, Kulikovskiy A, et al. Scientific and technical factors affecting the setting of Salmonella criteria for raw poultry: a global perspective. *J Food Prot.* 2010;73:1566-90.
19. Pereira JG, Spina TLB, Izidoro TB, Machado GP, Silva BF, Souza Junior LCT, et al. Abate Kosher: Isolamento de Salmonella spp. em carcaças de frango. In: *Anais do 3º Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária; 2009.* Bonito. Bonito: Associação Brasileira de Saúde Pública Veterinária; 2009.
20. Spina TLB, Pereira JG, Izidoro TB, Machado GP, Silva BF, Souza Junior LCT, et al. Avaliação higiênica dos instrumentos e equipamentos em uma planta de abate Kosher. In: *Anais do 3º Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária; 2009.* Bonito. Bonito: Associação Brasileira de Saúde Pública Veterinária; 2009.

Recebido em: 05/03/12

Aceito em: 03/05/12

ASPECTOS RELACIONADOS À FORMAÇÃO, FUNÇÃO E REGRESSÃO DOS CORPOS LÚTEOS SUPLEMENTARES EM ÉGUAS

Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva¹
José Nicolau Próspero Puoli Filho²
Cezinande de Meira³

RESUMO

Os corpos lúteos suplementares (CLS) são estruturas ovarianas que se desenvolvem a partir dos 36-40 dias de gestação, pelo estímulo hormonal da gonadotrofina coriônica equina (eCG) secretada pelos cálices endometriais. Os CLS são compostos pelos corpos lúteos acessórios, resultantes da luteinização dos folículos anovulatórios e pelos corpos lúteos secundários, formados a partir da ovulação de alguns folículos. Junto com o corpo lúteo primário e a unidade feto-placentária, constituem uma das fontes de progesterona que contribui para a manutenção da gestação nos equinos. O processo que dá origem aos corpos lúteos suplementares envolve, além do aspecto endocrinológico, fatores imunológicos desencadeados pela origem dos cálices endometriais, que por sua vez secretarão o eCG que estimulam a formação dos CLS. No entanto, o significado desta invasão e posterior resposta imunológica vão além da formação dos CLS e envolve mecanismos responsáveis pela manutenção da gestação. A suplementação de progesterona por estes corpos lúteos possui tempo limitado e a regressão dessas estruturas está ligada ao mecanismo de regressão dos cálices endometriais, embora esta última ocorra antes da regressão dos CLS. O estudo dos CLS possibilita o esclarecimento da real contribuição destes à manutenção da gestação, além de possibilitar redução nos tratamentos hormonais utilizados em programas de transferência de embriões.

Palavras-chave: corpos lúteos, cálices endometriais, égua, progesterona.

ASPECTS RELATED TO FORMATION, FUNCTION AND REGRESSION OF SUPPLEMENTARY CORPORA LUTEA IN MARES

ABSTRACT

Supplementary corpora lutea (SCL) are ovarian structures that develop from 36-40 days of gestation through equine chorionic gonadotropin (eCG) hormonal stimulation, secreted by the endometrial cups. The SCL are composed by accessory corpora lutea, resulting from follicle luteinization and by secondary corpora lutea, which arise from some follicles ovulation. These structures, together with the primary corpus luteum and the fetoplacental unit, constitute one of the progesterone sources that contribute to pregnancy maintenance in equine species. The process that gives rise to the supplementary corpora lutea involves endocrine and immunological features, triggered by the origin of the endometrial cups, that in turn secrete eCG stimulating SCL formation. However, the purpose of this invasion and its subsequent

¹ Mestranda do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu – SP – Brasil

² Professor Assistente Doutor do Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu – SP – Brasil

³ Professor Adjunto do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu – SP – Brasil.

Autor para correspondência: Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva. Email: elisa_santanna@yahoo.com.br Endereço: Depto. de Reprod. Animal e Radiol. Vet., FMVZ, Unesp – Campus de Rubião Jr., s/n – Botucatu – SP – Brasil. CEP: 18.618 – 970. Tel.: (14) 3811 6249

immunological response involves pregnancy maintenance mechanisms. Progesterone supplementation by these corpora lutea is limited and regression of these structures is connected to endometrial cups regression, although the latter occurs before the SCL regression. The SCL study allows explanation of the real contribution of these structures to pregnancy maintenance and also enables reduction of hormone treatment applied in embryo transfer programs.

Keywords: corpora lutea, endometrial cups, mares, progesterone.

ASPECTOS RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN, FUNCIÓN Y REGRESIÓN DE LOS CUERPOS LÚTEOS SUPLEMENTARIOS EN YEGUAS

RESUMEN

Los cuerpos lúteos suplementarios (CLS) son estructuras ováricas que se desarrollan a partir de los 36-40 días de gestación, por estímulo hormonal de la gonadotropina coriónica equina (eCG) secretada por las copas endometriales. Los CLS están compuestos por los cuerpos lúteos accesorios que resultan de la luteinización de los folículos anovulatorios y por los cuerpos lúteos secundarios, formados a partir de la ovulación de algunos folículos. En conjunto con el cuerpo lúteo primario y la unidad fetoplacentaria, los CLS constituyen una de las fuentes de progesterona encargadas de mantener la gestación en los équidos. El proceso que da origen a los CLS involucra, además del aspecto endocrinológico, factores inmunológicos desencadenados a consecuencia de la génesis de las copas endometriales, que a su vez, secretarán eCG estimulando así la formación de los CLS. Sin embargo, el significado de esta invasión y la respuesta inmunológica ulterior va más allá de la formación de los CLS y está relacionada con los mecanismos responsables por el mantenimiento de la gestación. La secreción de progesterona por parte de los CLS tiene un periodo limitado y su regresión está ligada al mecanismo de regresión de las copas endometriales, a pesar de esta última ocurrir antes que la de los CLS. El estudio de los CLS posibilita el esclarecimiento de la contribución real de estas estructuras al mantenimiento de la gestación, además de posibilitar la reducción de los tratamientos hormonales utilizados en los programas de transferencia de embriones.

Palabras clave: cuerpos lúteos, copas endometriales, yeguas, progesterona.

INTRODUÇÃO

A manutenção da gestação em equinos, assim como nas demais espécies domésticas, requer constante síntese de progesterona. Sabe-se que em éguas a progesterona tem inicialmente origem ovariana, sendo secretada pelo corpo lúteo primário (CLP) e, a partir dos 36-40 dias de gestação, pelo conjunto CLP e corpos lúteos suplementares (CLS). Aproximadamente aos 180 dias de gestação não há mais produção de progesterona pelos corpos lúteos da égua e a unidade feto-placentária, embora já contribuindo com a produção de progestágenos no período anterior à regressão dos CLS, assume a produção até a fase final da gestação (1).

A embriogênese na espécie equina possui uma característica única no que diz respeito ao desenvolvimento da cinta coriônica e à sua posterior invasão do endométrio (2). No início da gestação, concentrações altas do hormônio gonadotropina coriônica equina (eCG) aparecem no soro materno. O eCG é secretado por estruturas placentárias chamadas cálices endometriais, as quais se originam das células trofoblásticas da cinta coriônica e, após certo tempo de atividade, são imunologicamente destruídas (3, 4). Este hormônio, juntamente com

o hormônio folículo estimulante (FSH) liberado pela glândula pituitária, é responsável pela formação dos CLS na égua gestante. Os CLS complementam a produção de progesterona secretada pelo CLP, sendo observados aproximadamente no 40º dia de gestação e regredindo em torno dos 150-200 dias (4).

O objetivo desta revisão é discorrer sobre os principais aspectos relacionados aos corpos lúteos suplementares. Serão abordados os complexos mecanismos envolvidos com sua origem, assim como suas características, função e os processos responsáveis pela sua regressão. Além disso, será discutida a relação dos CLS com o tempo de tratamento com progestágenos administrados em receptoras acíclicas nos atuais programas de transferência de embriões.

PRODUÇÃO DE PROGESTERONA DURANTE A GESTAÇÃO EM ÉGUAS

A progesterona (P4) é o hormônio fundamental para a manutenção da prenhez (5, 6). Todos os animais domésticos necessitam da constante produção de P4 e de seus ativos metabólicos biológicos, como as 5α – dihidroprogesteronas (5α DHP), para manter adequado ambiente uterino para o desenvolvimento do feto. Diferentemente da cabra, porca, vaca e cadela, que apresentam a produção total de progesterona da gestação a partir do prolongamento da funcionalidade do corpo lúteo, a égua necessita de quatro componentes que se combinam para gerar a produção total de progesterona e progestágenos (Ex: 5α -pregnonas) necessários à manutenção da gestação, sendo estes o corpo lúteo primário, os corpos lúteos suplementares, o alantocório e as glândulas adrenais do feto (5).

O corpo lúteo primário (CLP) é aquele formado logo após a ovulação do ovócito que levou à formação do conceito. Em éguas gestantes o CLP persiste além da sua duração normal de 14-16 dias devido ao reconhecimento materno da gestação, período no qual o embrião secreta fatores luteotróficos para permitir a continuidade da gestação (1, 7). Tendo resistido ao processo da luteólise durante os dias 14-16 pós-ovulação, o CLP persiste nos ovários, mas os níveis de progesterona decrescem gradativamente durante os próximos 20 dias ou mais (7).

Os corpos lúteos suplementares começam a se desenvolver nos ovários ao redor dos 40 dias de gestação (1, 4, 8, 9). Os CLS produzem progesterona após a ovulação ou luteinização dos folículos, em resposta à fração luteinizante do eCG sobre os folículos mais avançados das ondas foliculares estimuladas pela contínua secreção de FSH pela pituitária (1, 7, 10).

A progesterona produzida pelos CLS complementa a P4 produzida pelo CLP e juntos mantêm a gestação nos primeiros cinco meses de prenhez (4). Todos os corpos lúteos, tanto o primário quanto os suplementares, degeneram por volta dos 150-200 dias de gestação (1, 4, 7-9).

Durante o período de expansão do alantocório, entre os dias 40 e 120 de gestação, as células trofoblásticas adquirem capacidade de sintetizar diversos hormônios (5). Dentre eles, destaca-se a progesterona e os metabólitos 5α DHP e 20α -hidroxi- 5α -pregnane-3-ona, observados ao redor dos 70 dias de gestação, sendo produzidos pela utilização exclusiva de fontes maternas de colesterol (11).

Desta forma, entre os dias 70 e 120 de gestação, as concentrações de progesterona e progestágenos encontradas no plasma representam uma mistura de P4 secretada pelos corpos lúteos primário e suplementares em processo de declínio e pelos progestágenos da placenta secretados pelo alantocório em crescimento (5).

Nas últimas 4 a 6 semanas de gestação, as glândulas adrenais em crescimento e em processo de maturação do feto secretam quantidades crescentes de pregnenolona, a qual é convertida à progestágeno pelo alantocório (12).

CÁLICES ENDOMETRIAIS

Por volta do 25º dia de gestação, células trofoblásticas fetais sofrem mudanças celulares para formar a cinta coriônica no local de junção do alantóide em desenvolvimento com o saco vitelínico em regressão. Essas células trofoblásticas da cinta coriônica invadem o epitélio uterino adjacente aproximadamente aos 38 dias de gestação, migrando para a lâmina própria para se diferenciar nos cálices endometriais (4, 7, 10). Cada unidade destes é composta de uma densa massa de células trofoblásticas epitelióides, binucleadas, entremeadas por alguns vasos sanguíneos e pelas porções fúndicas distendidas das glândulas endometriais (13). Macroscopicamente, os cálices constituem protuberâncias endometriais em forma de círculo ou ferradura ao redor do concepto no corno uterino gravídico (1). Medem 1 a 2 cm de largura, podendo variar consideravelmente no comprimento, desde estruturas bem individualizadas de 1 a 3 cm a “fitas” alongadas que podem medir acima de 20 cm de comprimento. Essas diferenças advêm da configuração do endométrio e da tonicidade do miométrio no momento da invasão da cinta coriônica (14).

A formação dos cálices endometriais possui dois aspectos importantes na manutenção da gestação. O primeiro diz respeito ao aspecto endócrino, em que há secreção de eCG pelas células dos cálices. O eCG, hormônio glicoproteico de alto peso molecular, é liberado inicialmente para a circulação materna pelo sistema linfático que drena o útero e mais tarde acumula-se na secreção exócrina das glândulas endometriais, pela liberação dos componentes presentes nas células dos cálices em degeneração (15). Este hormônio é observado em amostras de sangue de éguas gestantes em torno de 37 a 41 dias, aumentando rapidamente para níveis elevados ao redor dos 60-80 dias, quando então decresce lentamente para níveis baixos ou não detectáveis por volta dos 120 a 160 dias (4, 16). A característica mais incomum e interessante da molécula de eCG é a capacidade que possui de expressar atividade biológica tanto de FSH (hormônio folículo estimulante) quanto de LH (hormônio luteinizante), em uma fração de 1,4:1 (17), quando administrado para outras espécies domésticas (10). No entanto, o eCG possui baixa capacidade de se ligar aos receptores gonadais dos próprios equinos (<2%) em relação à capacidade ligante do FSH e LH da pituitária (18).

Na égua, durante o período de plena atividade, o componente LH do eCG luteiniza folículos que se desenvolvem durante a primeira metade da gestação pela contínua liberação de FSH pela pituitária (não pela fração FSH do eCG) ou eventualmente estimula a ovulação desses folículos (7), formando os corpos lúteos acessórios (luteinização dos folículos anovulatórios) e corpos lúteos secundários (ovulação dos folículos). O conjunto dos corpos lúteos acessórios e corpos lúteos secundários recebe a denominação de corpos lúteos suplementares (1, 4).

O segundo aspecto diz respeito à reação imunológica causada pelas células trofoblásticas invasoras que irão formar os cálices endometriais. Estas células especializadas expressam altas concentrações de antígenos paternos ligados ao complexo de histocompatibilidade maior da classe I (MHC I) antes e alguns dias após a invasão. Desta forma provocam uma forte resposta imune humoral pela mãe, verificada pela presença de altos títulos de anticorpos anti-paternos no soro (19, 20). Além disso, a invasão pelas células coriônicas também provoca uma forte resposta celular no endométrio. O aparecimento de linfócitos no estroma endometrial ocorre poucas horas após a invasão inicial das células da cinta coriônica e aumentam drasticamente em número a partir dos dias 60-70 de gestação. Nesta fase também há o aparecimento de células mononucleares, como as células do plasma, macrófagos e eosinófilos (21, 22).

As interações imunológicas que ocorrem pela formação dos cálices endometriais possuem importantes significados. O breve período de expressão dos antígenos conjugados ao

MHC I pelas células da cinta coriônica provoca um estímulo específico ao sistema imune materno, possivelmente neutralizando a citotoxicidade das células NK (do inglês “natural killer”) presentes no epitélio uterino no momento da invasão das células da cinta coriônica (23). Além disso, Donaldson et al. (24) demonstraram que os cálices endometriais já diferenciados não expressam moléculas do MHC I. A expressão prolongada do MHC I poderia ser deletéria, por provocar a geração de linfócitos T citotóxicos e consequente perda dos cálices endometriais e do feto.

A expressão dos antígenos conjugados ao MHC I também torna capaz a produção de células T auxiliares, como evidenciado pela presença de anticorpos anti-paternos na égua, assim como possibilita o reconhecimento pelos linfócitos T CD8+. A explicação mais aceitável para estes eventos imunológicos, a partir da presença desses elementos, é o direcionamento do sistema imune materno para a elaboração do padrão Th2 (tipo de célula auxiliar) de resposta, o qual favorece a manutenção da prenhez (25).

É importante ressaltar o estudo realizado por Allen et al. (26), em que foi realizada a transferência de embrião de jumento para égua receptora. No estudo em questão, foi verificado um pobre desenvolvimento das células trofoblásticas que constituem a cinta coriônica nos dias 36-38 de gestação. Como resultado, não houve desenvolvimento dos cálices endometriais e não foi constatada a presença do eCG no sangue materno. Ainda assim, o conceito continuou a se diferenciar e desenvolver até aproximadamente os dias 60 a 65 de gestação e a concentração de progesterona, proveniente do corpo lúteo primário, manteve-se constante entre 3 e 8 ng/mL neste período. A partir de então, na ausência da interdigitação normal das vilosidades coriônicas com o endométrio que acontecem normalmente nos dias 42 a 45, o processo de degeneração e morte foi observado e a concentração de P4 atingiu valores abaixo de 1 ng/mL.

O modelo experimental de Allen e colaboradores mostra a importância da reação causada pela formação dos cálices endometriais para ocorrer a placentação e a sobrevivência do embrião, pelo forte estímulo antigênico que as células trofoblásticas da cinta coriônica causam no organismo materno, fornecendo uma resposta imunológica protetora em relação ao feto.

A falha no desenvolvimento dos cálices endometriais neste modelo “embrião de jumento em útero de égua” ocorreu em 70% dos casos. Por outro lado, constatou-se que este processo não ocorreu em 30% dos casos restantes. Não houve o desenvolvimento dos cálices endometriais, entretanto ocorreu a implantação e interdigitação do alantocócion com o endométrio, em menor velocidade que nos casos de implantação convencional (embrião égua – útero égua), porém ocorreu o desenvolvimento normal do feto e o nascimento a termo. Nestas situações, a concentração de P4 também se manteve constante entre 40 e 70 dias de gestação (3 a 8 ng/mL), no entanto apresentou aumento gradual a partir dos 100 dias, possivelmente como resultado da elevação da síntese de progestágenos pela placenta (13). Este fato levantou a questão de quando este fenômeno pode ser imunologicamente ou geneticamente mediado. Além disso, questionou a real importância dos CLS, levando em consideração a ocorrência de gestações viáveis na ausência do desenvolvimento dos cálices endometriais e consequentemente dos corpos lúteos suplementares (7).

CARACTERÍSTICAS DOS CORPOS LÚTEOS SUPLEMENTARES

Os corpos lúteos suplementares são glândulas associadas à dinâmica folicular. Essas estruturas começam a se formar aproximadamente no 40º dia de gestação, desenvolvendo-se em glândulas luteais funcionais, muitas das quais são comparáveis ao corpo lúteo primário (1). O número de corpos lúteos aumenta à medida que a gestação avança, com relatos de

formação até os 100 dias (27, 28). Os CLS ainda são observados nos ovários de alguns animais aos 180-200 dias de gestação (1, 9).

A aparência dos CLS varia consideravelmente, refletindo em uma divergência na morfologia. Entre os dias 40 e 70, aproximadamente, alguns CLS são extremamente grandes e possuem inicialmente aparência de um coágulo. Estes, com o tempo, reduzem em tamanho e adquirem células luteais de forma semelhante ao corpo lúteo maduro. Entretanto, alguns corpos lúteos suplementares passam por estágios de desenvolvimento semelhantes àqueles do corpo lúteo primário: alguns são relativamente sólidos, enquanto outros apresentam cavidades centrais de diferentes diâmetros (1). Estruturas esféricas são originadas de folículos anovulatórios (8), ao passo que estruturas que apresentam um prolongamento em direção à fossa da ovulação são originadas do processo de ovulação (8, 9).

O estudo de Martin et al. (9) revelou diferença quanto à fase de ocorrência dos corpos lúteos acessórios e dos corpos lúteos secundários. Observou-se maior número de corpos lúteos formados a partir da ovulação (secundários) durante os primeiros 120 dias de gestação, com a primeira observação realizada nos dias 39-45 de gestação, enquanto verificou-se maior número de corpos lúteos formados pela luteinização (acessórios) durante os 121-198 dias de gestação, sendo o primeiro observado no 39º dia. Já Squires et al. (8) e Silva et al. (28) sugeriram que os corpos lúteos secundários estão presentes em uma fase mais inicial da gestação, compreendida entre os 40 e 70 dias e os acessórios principalmente após os 70 dias. Considerando o total de corpos lúteos formados durante a gestação, pelo menos dois terços dos CLS formam-se a partir da luteinização dos folículos (1, 9). No período compreendido entre 80 e 100 dias de gestação, observou-se o maior número de CLS (8, 28).

Meira et al. (27) avaliaram a atividade ovariana e a concentração plasmática de estrógeno e progesterona em jumentas gestantes, detectando-se o primeiro corpo lúteo secundário no dia $41,8 \pm 1,0$ (média \pm E.P.M.) e aumento em número até o dia 100 de gestação. Segundo estes autores, a maioria dos CLS formados (79,3%) apresentava formato esférico e pouca ecogenicidade, sugerindo que foram formados pela luteinização de folículos <30 mm de diâmetro. Já 13,8% do total de CLS apresentavam formato irregular, eram hiperecogênicos e pareciam se prolongar em direção à fossa ovulatória, sugerindo que alguns corpos lúteos suplementares podem formar-se após a ovulação de grandes folículos. Esses achados mostram a similaridade do padrão de desenvolvimento morfológico dos corpos lúteos suplementares em éguas e jumentas.

Em relação à concentração de progesterona sintetizada pelos CLS, Ginther (1), Allen (7) e De Mestre et al. (10) avaliaram o perfil hormonal de éguas no período em que os CLS encontravam-se presentes nos ovários, observando valores máximos de 15 a 20 ng/mL, aproximadamente, similares aos encontrados por Meira et al. (27) ao avaliarem a concentração de P4 em jumentas gestantes.

Outra informação a se considerar é o número de corpos lúteos suplementares formados por animal ou ovário. É importante observar que esta informação é escassa na literatura. Martin et al. (9) observaram a presença de dois a sete corpos lúteos suplementares por animal. Meira et al. (27) e Silva et al. (28) encontraram valores semelhantes em jumentas (dois a sete) e éguas (dois a seis), respectivamente, mostrando uma similaridade no número de CLS encontrado pelos autores citados.

REGRESSÃO DOS CÁLICES ENDOMETRIAIS E CORPOS LÚTEOS SUPLEMENTARES

Logo após a descoberta da gonadotrofina coriônica equina em 1930, Cole e colaboradores chamaram a atenção para a próxima relação existente entre a secreção do eCG e o desenvolvimento de corpos lúteos suplementares nos ovários da égua (29). Assim como

há uma coincidência entre o desenvolvimento e persistência dos cálices endometriais produtores de eCG e os CLS, quando ocorre a regressão dos cálices, cessa o estímulo para a formação dos CLS (10). No entanto, a regressão dos cálices endometriais não coincide exatamente com a regressão dos CLS. A regressão dos corpos lúteos suplementares ocorre mais tardiamente, sendo possível observar a presença de CLS funcionais (com capacidade sintética de progesterona) até o dia 198 de gestação. Porém, na grande maioria dos casos, a redução da produção de progesterona é verificada a partir dos 160 dias de gestação, sugerindo que a partir deste momento ocorreu o processo de regressão (9).

A regressão dos cálices, responsável por cessar o estímulo à formação dos CLS, está ligada à resposta imune celular. O aparecimento de linfócitos no estroma do endométrio ocorre poucas horas após a invasão inicial das células da cinta coriônica e aumentam em número drasticamente a partir do dia 60-70 de gestação. Nesta fase também há o aparecimento de células mononucleares, como as células do plasma, macrófagos e eosinófilos (21, 22). Inicialmente, o acúmulo de leucócitos apenas reveste as células fetais estranhas ao organismo materno, porém, acima do 70º dia de gestação, quando as células da região central dos cálices endometriais começam a degenerar, os leucócitos invadem ativamente o tecido e atacam os cálices endometriais, culminando na morte e descamação de todo o cálice, com processo de necrose aproximadamente nos dias 100-120 de gestação (22).

Antczac e Allen (30) acreditavam que a morte dos cálices endometriais nos dias 100-120 de gestação era resultado da reação leucocitária que se formava no tecido materno em resposta à presença dos cálices fetais. Entretanto, estudos recentes sugerem que os mecanismos envolvidos são mais complexos. Primeiro, os cálices endometriais não expressam moléculas do MHC I (24) e também não expressam o MHC da classe II (31), responsável por montar resposta citotóxica. A ausência destas moléculas que apresentariam o antígeno paterno ao sistema imune evita que os cálices sejam destruídos pelos linfócitos citotóxicos (10). Segundo, a infiltração de células CD4+ presente ao redor dos cálices não inclui apenas linfócitos T auxiliares tradicionais e sim linfócitos T que possuem capacidade de regular e suprimir a resposta imune (32). Terceiro, as células fetais dos cálices endometriais possuem atividade inerente de modular a imunidade; produtos secretórios das células da cinta coriônica suprimem a proliferação de linfócitos e a expressão de citocinas (33).

Além disso, ao serem transplantadas para locais fora do útero em éguas não-prenhes (34, 35), as células da cinta coriônica apresentam características similares às dos cálices, incluindo secreção de eCG e habilidade de resistir à resposta imune celular e humoral montadas pela receptora (10). Estas habilidades apresentadas sugerem que as células binucleadas (cinta coriônica e cálices endometriais) possuem autocontrole, controlando seu próprio destino (10) e é possível que a reação leucocitária formada é, simplesmente, uma resposta à presença dos cálices endometriais em degeneração no final de seu tempo normal de vida (36).

CORPOS LÚTEOS SUPLEMENTARES E TRATAMENTO HORMONAL EM ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS

Atualmente, nos programas de transferência de embriões, faz-se uso da administração de progestágenos exógenos (progesterona natural ou sintética) em receptoras de embriões acíclicas, com objetivos de estabelecer e manter a gestação. Os tratamentos hormonais utilizados, que consistem na aplicação de estrógenos e posteriormente progestágenos, preparam a receptora para receber o embrião, mimetizando a condição fisiológica que ocorre nas éguas cíclicas (37). Após a confirmação da gestação na receptora, acredita-se que a aplicação dos progestágenos deve ser continuada até o momento em que a unidade feto-

placentária está suficientemente madura para manter a gestação, com a produção de seus próprios progestágenos (11). Desta forma, a aplicação da progesterona natural ou sintética é realizada até 100 a 120 dias de gestação para garantir a manutenção da prenhez nas centrais de transferência de embriões (38, 39).

Em contrapartida, pesquisas recentes correlacionam a interrupção do tratamento com a formação dos corpos lúteos suplementares. Greco et al. (38) sugeriram que a interrupção do tratamento pode ser realizada antes da maturação feto-placentária, a partir dos 40 dias de gestação, quando os CLS surgem nos ovários.

Já Silva et al. (40) sugeriram que o número de CLS formados e o tempo decorrido desde a primeira formação até o dia da interrupção do tratamento são variáveis importantes envolvidas na manutenção da gestação. Segundo estes autores, análises da concentração da progesterona plasmática, sintetizada pelos CLS, são necessárias para definir o momento de interrupção do tratamento. Em um futuro próximo, é possível que o tratamento hormonal administrado nas receptoras acíclicas seja reduzido, beneficiando proprietários e veterinários.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção extra de progesterona secretada pelos corpos lúteos suplementares auxilia na manutenção da gestação até aproximadamente os 100 dias, quando então a unidade feto-placentária está suficientemente madura para assumir a produção de progestágenos sem a contribuição dos ovários. No entanto, como demonstrado por Allen e colaboradores em 1987, foi verificada a sobrevivência de 30% das gestações extraespecíficas de jumentos em éguas sem a presença de qualquer corpo lúteo suplementar pela falha no desenvolvimento dos cálices endometriais. Este fato leva à crença de que a progesterona secretada pelos corpos lúteos suplementares pode não ser essencial para a manutenção da gestação.

Estudos envolvendo os corpos lúteos suplementares permitem o esclarecimento da real contribuição destes à manutenção da gestação e possibilita a redução do tempo de tratamento de protocolos hormonais utilizados em receptoras acíclicas, amplamente utilizados em programas de transferência de embriões.

REFERÊNCIAS

1. Ginther OJ. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2º ed. Wisconsin: Equiservices; 1992.
2. Allen WR. The physiology of early pregnancy in the mare. In: Proceedings of the 46th Annual Convention of the AAEP; 2000, San Antonio. San Antonio, Texas: AAEP; 2000. v.46, p.338-54.
3. Allen WR, Moor RM. The origin of the equine endometrial cups. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J Reprod Fertil.* 1972;29:313-6.
4. Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Scumacher J, Love CC, Hinrichs K, et al. Manual of equine reproduction. 3ª ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2011.
5. Allen WR. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod Domest Anim.* 2001;36:121-31.
6. Hafez ESE, Hafez B. Reprodução animal. 7ª ed. Barueri: Manole; 2004.
7. Allen WR. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction.* 2001;12:513-27.

8. Squires EL, Douglas RH, Steffenhagen WP, Ginther OJ. Ovarian changes during the estrous cycle and pregnancy in mares. *J Anim Sci.* 1974;38:330-8.
9. Martin JL, Saltiel A, Evans JW. Progesterone synthesis by different types of corpora lutea during the first 198 days of pregnancy. *J Equine Vet Sci.* 1989;9:84-7.
10. De Mestre AM, Antczak DF, Allen WR. Equine chorionic gonadotropin (eCG). In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine reproduction.* 2^a ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2011. p.1648-63.
11. Holtan DW, Squires EL, Lapin DR, Ginther OJ. Effect of ovariectomy on pregnancy in mares. *J Reprod Fertil.* 1979;127 Suppl:457-63.
12. Thorburn GD. A speculative view of parturition in the mare. *Equine Vet J.* 1993; 14 Suppl:41-9.
13. Allen WR, Short RV. Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: Anything goes. *J Hered.* 1995;88:384-92.
14. Allen WR, Wilsher S. A review of implantation and early placentation in the mare. *Placenta.* 2009;30:1005-15.
15. Allen WR, Stewart F. Equine chorionic gonadotropin. In: McKinnon AO, Voss JL. *Equine reproduction.* Malvern Pennsylvania: Lea & Febinger; 1993. p.397-403.
16. Cole HH, Hart GH. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *Am J Physiol.* 1930;83:57-68.
17. Stewart F, Allen WR, Moor RM. Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *J Endocrinol.* 1976;71:371-82.
18. Stewart F, Allen WR. The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues. *J Reprod Fertil.* 1979;27 Suppl:431-40.
19. Antczak DF, Bright SM, Remick LH, Bauman B. Lymphocyte alloantigens of the horse. I Serologic and genetic studies. *Tissue Antigens.* 1982;20:172-87.
20. Kydd J, Miller J, Antczak DF, Allen WR. Maternal anti-fetal cytotoxic antibody responses of equids during pregnancy. *J Reprod Fertil.* 1982;32 Suppl:361-9.
21. Amoroso EC. The endocrinology of pregnancy. *Br Med Bull.* 1955;17:117-25.
22. Allen WR. The influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progestagen production in equids. *J Reprod Fertil.* 1975;23 Suppl:405-13.
23. Lannier LL, Phillips JH. Natural killer cells. *Curr Opin Immunol.* 1992;4:38-42.
24. Donaldson WL, Oriol JG, Plavin A, Antczak DF. Developmental regulation of class I major histocompatibility complex antigen expression by equine trophoblastic cells. *Differentiation.* 1992;52:69-78.

25. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993;14:353-6.
26. Allen WR, Kydd JH, Boyle MS, Antczak DF. Extraspecific donkey-in-horse pregnancy as a model of early fetal death. *J Reprod Fertil*. 1987;35 Suppl:197-209.
27. Meira C, Ferreira JCP, Papa FO, Henry M. Ovarian activity and plasma concentrations of progesterone and estradiol during pregnancy in jennies. *Theriogenology*. 1998;49:1465-73.
28. Silva ESM, Frade SF, Meira C. Characterization of secondary corpora lutea formation in non-cyclic and cyclic embryo recipient mares (partial results). In: *Proceedings of the 25th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society; 2011, Cumbuco. Cumbuco, Ceará: SBTE; 2011. p.421.*
29. Cole HH, Howell CF, Hart GH. The changes occurring in the ovary of the mare during pregnancy. *Anat Rec*. 1931;49:199-209.
30. Antczak DF, Allen WR. Maternal immunological recognition of pregnancy in equids. *J Reprod Fertil*. 1989;37 Suppl:69-78.
31. Donaldson WL, Zhang CH, Oriol JG, Antczak DF. Invasive equine trophoblast expresses conventional class I major histocompatibility complex antigens. *Development*. 1990;110:63-71.
32. De Mestre AM, Noronha L, Wagner B, Antczak DF. Split immunological tolerance to trophoblast. *Int J Dev Biol*. 2010;54:445-55.
33. Flaminio MJ, Antczak DF. Inhibition of lymphocyte proliferation and activation: a mechanism used by equine invasive trophoblast to escape the maternal immune response. *Placenta*. 2005;26:148-59.
34. De Mestre AM, Bacon SJ, Costa CC, Leadbeater JC, Noronha LE, Stewart F, et al. Modeling trophoblast differentiation using equine chorionic girdle vesicles. *Placenta*. 2008;29:158-69.
35. Adams AP, Antczak DF. Ectopic transplantation of equine invasive trophoblast. *Biol Reprod*. 2001;64:753-63.
36. Lunn P, Vagnoni KE, Ginther OJ. The equine immune response to endometrial cups. *J Reprod Immunol*. 1997;34:203-16.
37. Pinto CRF. Progestagens and progesterone. In: Mc Kinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine reproduction*. 2º ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2011. p.1811-7.
38. Greco GM, Avanzi BR, Fioratti EG, Queiroz FJR, Meira C, Alvarenga MA. Efeito da interrupção do tratamento com progesterona em éguas receptoras acíclicas apresentando a formação de corpos lúteos acessórios. *Acta Sci Vet*. 2008;36 Supl 2:590.
39. Rocha Filho AN, Pessôa MA, Gioso MM, Alvarenga MA. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. *Anim Reprod*. 2004;1:91-5.

40. Silva ESM, Frade S, Ferreira JC, Puoli Filho JNP, Meira C. Effect of interrupting altrenogest treatment in non-cyclic recipient mares on pregnancy maintenance: partial results. In: Resúmenes del 2º Congreso Argentino de Reproducción Equina; 2011, Rio Cuarto. Rio Cuarto: UNRC; 2011. p.551-3.

Recebido em: 14/12/11

Aceito em: 28/05/12

EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO NO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

Aline Silva Rocha^{1*}
Frederico Ozanam Papa²

RESUMO

Os hormônios tireoidianos são essenciais para o crescimento, o desenvolvimento e o metabolismo de diversos tecidos e órgãos. Atualmente, sabe-se que estes hormônios desempenham uma importante atividade na função testicular em diversas espécies por meio de receptores específicos situados, principalmente, nas células de Sertoli. As disfunções tireoidianas, em especial o hipotireoidismo, afeta a espermatogênese e a esteroidogênese testicular podendo levar à infertilidade. Embora sejam relacionadas diversas alterações reprodutivas em animais que apresentam hipotireoidismo, os resultados das pesquisas são controversos e pouco se conhece sobre a ação direta dos hormônios tireoidianos no sistema reprodutor. Por meio deste artigo, objetiva-se apresentar uma revisão na qual serão descritos os efeitos do hipotireoidismo na função testicular e glândulas acessórias.

Palavras-chave: hipotireoidismo, testículo, hormônios tireoidianos, células de Sertoli, triiodotironina.

EFFECTS OF HYPOTHYROIDISM ON MALE REPRODUCTIVE SYSTEM

ABSTRACT

Thyroid hormones are essential for growth, development and metabolism in many tissues and organs. Currently, it is known that these hormones play an important activity in testicular function in several species through specific receptors located, mainly, in Sertoli cells. The thyroid dysfunction, particularly hypothyroidism, affects testicular steroidogenesis and spermatogenesis and may lead to infertility. Although several reproductive changes have been related in animals with hypothyroidism, the results of some studies are controversial and little is known about the direct effects of thyroid hormones in the reproductive system. Through this article, we report a revision in which we will describe the effects of hypothyroidism in the testicular function and accessory glands.

Keywords: hypothyroidism, testis, thyroid hormones, Sertoli cells, triiodothyronine.

EFFECTOS DEL HIPOTIROIDISMO EN SISTEMA REPRODUCTIVO MASCULINO

RESUMEN

Las hormonas tiroideas son esenciales para el crecimiento, el desarrollo y el metabolismo en varios tejidos y órganos. En la actualidad, se sabe que estas hormonas desempeñan una actividad importante en la función testicular en varias especies a través de receptores específicos situados principalmente en las células de Sertoli. Las disfunciones de la tiroides, en especial el hipotiroidismo, afecta a la espermatogénesis y la esteroidogénesis testicular pudiendo llevar a la infertilidad. A pesar de haber sido descritas diversas alteraciones

¹ Mestranda do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ- Unesp / Botucatu. * Correspondência: Distrito de Rubião Jr., s/n - Botucatu, SP - 18618-000. Tel/Fax: (14) 3811-6249. E-mail: aline-srocha@hotmail.com

² Professor Titular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ-Unesp / Botucatu, SP.

reproductivas relacionadas con el hipotireoidismo en animales, los resultados de las investigaciones son contradictorios y poco se sabe sobre los efectos directos de las hormonas tiroideas en el sistema reproductor. En esta revisión se describen los efectos del hipotireoidismo sobre la función testicular y glándulas accesorias.

Palabras claves: hipotireoidismo, testículos, hormonas tiroideas, células de Sertoli, triyodotironina.

INTRODUÇÃO

O hipotireoidismo é uma alteração endócrina caracterizada por baixos níveis séricos dos hormônios triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4). Esses hormônios sintetizados pela glândula tireóide são responsáveis por efeitos fisiológicos que causam alterações em praticamente todas as vias metabólicas e órgãos.

Sabe-se que os hormônios da tireóide desempenham um importante papel no desenvolvimento e na função testicular exercendo ação mediada por receptores nucleares específicos (TRs) de T_3 , os quais exercem a atividade biológica dos hormônios tireoidianos. A presença desses receptores já foi descrita em células germinativas em desenvolvimento, células de Sertoli, células de Leydig (1), epidídimo (2) e próstata (3).

A deficiência dos hormônios tireoidianos (HT) pode resultar em alterações na morfologia testicular e na função reprodutiva. Pesquisadores sugerem que o incorreto funcionamento da tireóide afeta os hormônios envolvidos na reprodução, principalmente o Hormônio Luteinizante (LH), o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) (4) e a Testosterona (5). Baixos níveis dos hormônios tireoidianos podem interferir na proliferação das células de Sertoli e Leydig (6, 7), além de exercer ação direta no epidídimo (8) e na próstata comprometendo o desempenho reprodutivo de várias espécies (9).

Embora sejam descritas diversas alterações reprodutivas em portadores de hipotireoidismo, existem aspectos contraditórios sobre o papel dos hormônios tireoidianos na fisiologia testicular e os resultados das pesquisas são conflitantes inclusive dentro de uma mesma espécie. Apresenta-se nesta revisão uma descrição dos efeitos do hipotireoidismo no sistema reprodutor masculino.

REVISÃO DE LITERATURA

Hormônios Tireoidianos e Função Testicular

Os hormônios tireoidianos desempenham importante papel tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da função testicular. Além de alterações morfológicas no testículo, a deficiência destes hormônios pode alterar a fertilidade e o comportamento sexual (10).

Disfunções no status tireoidiano têm sido relacionadas a alterações na produção dos hormônios envolvidos na reprodução, volume do ejaculado, motilidade espermática e morfologia dos testículos de ratos e humanos (1, 10, 11).

Pesquisadores demonstraram que o T_3 regula o desenvolvimento e maturação testicular e controla a proliferação e diferenciação das células de Sertoli e de Leydig em ratos e outras espécies de mamíferos (6, 7). Além disso, foi confirmado que os hormônios da tireóide exercem efeitos na espermatogênese de ratos adultos, principalmente, durante a fase de espermiogênese. Porém, o efeito desses hormônios em animais adultos ainda não está completamente elucidado (12).

Em homens que apresentavam hipotireoidismo, foram notadas disfunções sexuais que incluíam: diminuição da libido, disfunção erétil, atraso na ejaculação, impotência e ejaculação precoce. Os autores observaram que a maioria dos homens que possui distúrbio tireoidiano

manifesta alguma disfunção sexual, porém, essas disfunções são reversíveis ao se restabelecer os níveis normais dos HT (10).

O hipotireoidismo induzido com ^{131}I (radioisótopo do iodo) em cães da raça beagle não afetou a função reprodutiva destes machos adultos avaliados por um período de 2 anos (13). Por outro lado, foi relatado atraso na espermatogênese em filhotes tratados com propiltiouracil (PTU) (14) e diminuição do tamanho testicular, subfertilidade ou infertilidade em uma colônia de beagles com tireoidite e orquite (15). Segalini et al. (16) não encontraram diferença significativa nas concentrações de HT em cães férteis e subférteis.

Receptores para Hormônios Tireoidianos no Testículo

Os efeitos biológicos induzidos pelos HT são mediados por receptores nucleares específicos (TRs), os quais são compostos por duas isoformas principais: TR α e TR β . O primeiro origina TR α 1, TR α 2 e TR α 3, já o segundo, TR β 1 e TR β 2 (1, 17). As três isoformas funcionais foram identificadas como: TR α 1, TR β 1 e TR β 2 (7, 18). TR α 2 e TR α 3 não apresentam sítio de ligação hormonal, sendo considerados inibidores da ação dos HT (19).

Em estudo realizado por Jannini et al. (20), foi observada maior expressão de receptores de T₃ no testículo de ratos no período fetal e perinatal, diminuindo significativamente até a puberdade e praticamente desaparecendo no animal adulto, quando a maturação testicular apresentava-se completa. Esses receptores foram identificados nas células de Sertoli e sua concentração diminuiu expressivamente no momento em que essas células cessaram sua atividade mitótica.

Em 1992, Palmero et al. (21) ao verificarem a existência de receptores de T₃ no testículo de leitões, detectaram a presença dos mesmos nas células de Sertoli, entretanto, não encontraram os receptores nas células de Leydig.

Segundo Buzzard et al. (1), a principal isoforma de TRs expressa no testículo de ratos em desenvolvimento e adultos é TR α 1. Este receptor foi identificado nas células de Sertoli em proliferação, células de Leydig e células germinativas desde espermatogônias intermediárias até espermatócitos em paquíteno, indicando que os hormônios tireoidianos podem atuar na função testicular de animais adultos funcionando como moderador para a sobrevivência das células germinativas. TR β 1 foi encontrado em pequena quantidade nas células de Sertoli imaturas e células germinativas pela técnica de imunoistoquímica.

Canale et al. (18) concluíram que TR α 1 está presente no testículo de ratos de todas as idades sugerindo que o testículo do animal adulto é diretamente responsivo ao T₃ e que a ação dos HT afeta não apenas a maturação e o desenvolvimento testicular, mas também o metabolismo das células tubulares. Em 2000, Jannini et al. (22) também demonstraram a presença de TR α 1 no testículo de homens. Tanto Canale et al. (18) quanto Jannini et al. (22) não detectaram a presença de TR β no testículo de homens, assim como descrito anteriormente por Jannini et al. (20) em ratos. Este resultado difere do encontrado por Buzzard et al. (1), os quais observaram a expressão de TR β 1 no testículo de ratos pré-púberes.

A presença de TR α 1 e TR β 1 também foi descrita no epidídimo de ratos adultos evidenciando uma ação direta dos HT sobre o epidídimo (2).

A expressão dos receptores de T₃ foi observada na próstata de humanos e, de acordo com Esquet et al. (3), os mesmos estão presentes em carcinomas prostáticos.

Efeito do Hipotireoidismo nas Células de Sertoli

A regulação da proliferação das células de Sertoli e dos fatores que controlam o estabelecimento de sua população adulta é muito importante. A quantidade de células de Sertoli no testículo estabelece o limite de produção de células germinativas, pois é o componente somático do túbulo seminífero que proporciona um ambiente adequado ao desenvolvimento e maturação das células germinativas (6).

Já foi comprovado que as células de Sertoli apresentam um período fixo de proliferação e maturação, não havendo mitose ou diferenciação após esta fase de desenvolvimento. Assim, o número total de células de Sertoli é determinado antes da fase adulta (6).

O FSH e o T_3 são considerados os maiores reguladores endócrinos do desenvolvimento do epitélio seminífero (17), visto que o primeiro atua como fator mitogênico durante a proliferação das células de Sertoli (23) e o segundo interfere no período de proliferação pela regulação da maturação dessas células (24, 25).

Em ratos, foi constatado que a redução no nível dos hormônios da tireóide ocasiona um atraso na transição da fase proliferativa para a fase madura das células de Sertoli, um prolongamento do período mitogênico e aumento da população adulta dessas células (24-28).

Devido ao tratamento com propiltiouracil (PTU), a imaturidade das células de Sertoli culmina em retardo na abertura do lume dos túbulos seminíferos e incapacidade destas células em sustentar estágios avançados do desenvolvimento das células espermatogênicas, levando a degenerações das células germinativas e diminuição do tamanho dos testículos neste período (29). Após o tratamento com PTU, o restabelecimento do eutireoidismo possibilita a maturação completa das células de Sertoli. A população aumentada destas células interage com a população de células espermatogoniais, estabelecendo a espermatogênese completa (26). Isto acarreta mudanças morfológicas e funcionais, com conseqüente aumento do tamanho dos testículos e da produção espermática (30).

Foi demonstrado em muitos estudos que o hipotireoidismo neonatal transitório induzido pelo PTU aumenta significativamente o número de células de Sertoli, o peso dos testículos e a produção espermática em ratos (24, 31, 32), camundongos (27, 33), galos domésticos (34) e tilápias (35). Mesmo após a normalização dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos, a população das células de Sertoli permanece aumentada, resultando em uma maior quantidade de células germinativas e de espermatozóides produzidos. Portanto, o hipotireoidismo neonatal transitório resulta em um aumento irreversível do volume testicular no animal adulto (8).

A comparação entre humanos e outras espécies deve ser cuidadosa, pois o padrão de proliferação e diferenciação do epitélio seminífero de humanos antes da puberdade ainda não foi completamente elucidado. Todavia, acredita-se que no testículo humano ocorra um prolongamento no período proliferativo das células de Sertoli em caso de deficiência de HT, assim como descrito em ratos (17).

Efeito do Hipotireoidismo na Esteroidogênese Testicular

As células de Leydig se diferenciam no período pré-puberal e tem como precursoras as células mesenquimais da região peritubular (7).

Em animais pré-púberes com hipotireoidismo, há um atraso na diferenciação das células mesenquimais em células de Leydig. Observa-se um aumento no número de células precursoras que ficam acumuladas no interstício testicular acarretando um maior número de células de Leydig na fase adulta (36). No entanto, estas células apresentam tamanho reduzido e menor capacidade na produção de testosterona quando comparadas a animais normais (5).

Animais tireoidectomizados ou hipotireoideos podem apresentar uma diminuição significativa tanto dos níveis basais quanto do número de pulsos e secreção total de LH e FSH (4). De acordo com El Shennawy et al. (37), os níveis circulantes desses hormônios não retornam aos níveis basais de animais normais após o restabelecimento do eutireoidismo. Provavelmente, isto ocorre por um efeito secundário a um relativo aumento da quantidade de células de Leydig observado nos animais hipotireoideos durante a fase de desenvolvimento e diferenciação dessas células. Além do LH e do FSH, já foi demonstrado em ratos que a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), do hormônio do crescimento (GH) e da testosterona também fica reduzida (38).

Os testículos de ratos tratados com PTU apresentaram um número de células de Leydig 70% maior que o grupo controle. Entretanto, o tamanho dessas células, o número de receptores de LH e o potencial esteroidogênico estavam reduzidos, o que justificou o fato das concentrações plasmáticas de testosterona serem mais baixas no grupo tratado (5).

Em suínos tratados com PTU no período neonatal, não ocorreu alteração no número total de células de Leydig e concentrações plasmáticas de testosterona, demonstrando que o padrão de proliferação e maturação das células de Leydig nesta espécie difere do padrão observado em ratos (39).

Efeito do Hipotireoidismo nos Órgãos Sexuais Acessórios

Quando se trata de sistema reprodutor masculino, o testículo é apontado como o maior local de ação dos HT baseado na presença dos receptores específicos de T_3 nas células de Sertoli e de Leydig (5, 17). No entanto, os órgãos sexuais acessórios também sofrem influência dos HT (2, 40).

O eutireoidismo é fundamental para a manutenção normal do metabolismo intermediário e da maturação espermática no epidídimo de ratos (8), principalmente, durante o período fetal e neonatal para que se mantenha a fertilidade normal ao atingirem a idade adulta (40, 41).

Os maiores reguladores da estrutura e função epididimária são a testosterona e a 5α -dihidrotestosterona, as quais atuam por meio de uma alta afinidade aos receptores específicos de andrógeno (RA) presentes no epidídimo. Na deficiência de andrógeno, os espermatozoides se tornam imóveis, perdem a capacidade de fertilização e morrem devido à disfunção epididimária (41).

Os HT desempenham um importante papel no transporte da testosterona pela proteína ligadora de andrógeno (ABP) para o epidídimo. O bloqueio transitório da ação dos HT durante o período fetal ou pós-natal aumenta a produção de ABP e o nível de andrógeno no epidídimo de ratos adultos. Os HT modulam a atividade da 5α -redutase no epidídimo modificando a biodisponibilidade da testosterona e, conseqüentemente, da diidrotestosterona (40).

Anbalagan et al. (41) observaram redução na motilidade progressiva de espermatozoides, diminuição de peso do epidídimo e um significativo decréscimo na concentração dos receptores nucleares de andrógenos na cauda do epidídimo de ratos adultos induzidos ao hipotireoidismo transitório durante o período fetal. O comprometimento na maturação espermática pós-testicular em razão da redução na biodisponibilidade de andrógenos e na expressão de RA no epidídimo levou à infertilidade.

Em estudo realizado por Jiang et al. (42), o hipotireoidismo levou à redução no peso do epidídimo de ratos adultos e à infertilidade. Além disso, havia elevada presença de gota citoplasmática em espermatozoides do epidídimo. Após o tratamento com tiroxina, a maturação e a fertilidade dos espermatozoides epididimários foram recuperadas e a quantidade de espermatozoides com gota citoplasmática foi minimizada.

Os HT são considerados importantes reguladores da glândula prostática, porém, o mecanismo pelo qual isto ocorre permanece incompreendido (9). O hipotireoidismo neonatal transitório prolonga o período de crescimento e morfogênese ductal no lóbulo ventral da próstata de ratos (43).

Sabe-se que para que haja um crescimento normal, diferenciação e manutenção da integridade morfofuncional da próstata, são necessárias interações de concentrações constantes dos andrógenos com seus receptores (44). A manutenção do eutireoidismo durante o período fetal e neonatal é essencial para a expressão dos RA em proporções adequadas na glândula prostática na idade adulta (9).

Aruldhas et al. (9) verificaram um efeito lobo-específico do hipotireoidismo gestacional/neonatal transitório na transcrição dos RA na próstata de ratos adultos e uma considerável diminuição no peso do lobo dorso-lateral e do lobo ventral da próstata.

Já foi constatado que o T_3 desempenha um importante papel na proliferação de linhagens celulares de carcinoma prostático (45). Este hormônio estimula a expressão do antígeno específico da próstata, um processo andrógeno dependente, em linhagens celulares de câncer de próstata em humanos (46).

Segundo Lehrer et al. (47), T_3 pode ser utilizado como um biomarcador em patologias prostáticas, pois homens que apresentam hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata apresentam um expressivo aumento dos níveis séricos de T_3 .

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação dos receptores de T_3 nos testículos foi fundamental para um conhecimento mais aprofundado da maneira como os HT atuam e de sua influência nas gônadas masculinas. A maior expressão destes receptores durante a fase de desenvolvimento testicular comprova a necessidade do eutireoidismo, principalmente, durante o período fetal e neonatal.

Os hormônios tireoidianos são de grande importância para o adequado funcionamento do sistema reprodutor masculino tanto no que se refere ao desenvolvimento quanto à manutenção da função testicular, exercendo ação direta sobre os processos de espermatogênese e esteroidogênese testicular.

REFERÊNCIAS

1. Buzzard JJ, Morrison JR, O'bryan MK, Song Q, Wreford NG. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod.* 2000;62:664-9.
2. De Paul AL, Mukdsi JH, Pellizas CG, Montesinos M, Gutiérrez S, Susperreguy S, et al. Thyroid hormone receptor $\alpha 1$ - $\beta 1$ expression in epididymal from euthyroid and hypothyroid rats. *Histochem Cell Biol.* 2008;129:631-42.
3. Esquenet M, Swinnen JV, Heyns W, Verhoeven G. Triiodothyronine modulates growth, secretory function and androgen receptor concentration in the prostatic carcinoma cell line LNCaP. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;109:105-11.
4. Maia AL, Favaretto AL, Carvaho TL, Rodrigues JA, Iazigi N. Hypothyroidism affects pulsatile LH secretion in pubertal orchietomized rats. *Arch Physiol Biochem.* 1995;103:516-20.
5. Hardy MP, Kirby JD, Hess RA, Cooke PS. Leydig cells increase their number but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism. *Endocrinology.* 1993;132:2417-20.
6. Holsberger DR, Cooke PS. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res.* 2005;322:133-40.
7. Mendis-Handagama SM, Siril Ariyaratne HB. Leydig cells, thyroid hormones and steroidogenesis. *Indian J Exp Biol.* 2005;43:939-62.

8. Maran RRM, Priyadarsini D, Udhayakumar RCR, Arunakaran J, Aruldas MM. Differential effect of hyperthyroidism on rat epididymal glycosidases. *Int J Androl.* 2001;24:206-15.
9. Aruldas MM, Ramalingam N, Jaganathan A, Sashi AMJ, Stanley JA, Nagappan A, et al. Gestational and neonatal-onset hypothyroidism alters androgen receptor status in rat prostate glands at adulthood. *Prostate.* 2010;70:689-700.
10. Carani C, Isidori AM, Granata A, Carosa E, Maggi M, Lenzi A, et al. Multicenter study on the prevalence of sexual symptoms in male hypo and hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:6472-9.
11. Krassas GE, Poppe K, Glinoe D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev.* 2010;31:702-55.
12. Wajner SM, Wagner MS, Melo RC, Parreira GG, Chiarinigarcia H, Bianco AC, et al. Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in germ cells of adult rat testis. *J Endocrinol.* 2007;194:47-54.
13. Johnson C, Olivier NB, Nachreiner R, Mullaney T. Effect of ¹³¹I-Induced hypothyroidism on indices of reproductive function in adult male dogs. *J Vet Intern Med.* 1999;13:104-10.
14. Mayer E. Inhibition of thyroid function in beagle puppies by prophythiouracil without disturbance of growth and health. *Endocrinology.* 1947;40:165-81.
15. Fritz TE, Lombard LS, Tyler AS, Norris WP. Pathology and familial incidence of orchitis and its relation to thyroiditis in a closed beagle colony. *Exp Mol Pathol.* 1976;24:142-58.
16. Segalini V, Hericher T, Grellet A, Rosenberg D, Garnier F, Fontbonne A. Thyroid function and infertility in the dog: a survey in five breeds. *Reprod Domest Anim.* 2009;44:211-3.
17. Jannini EA, Ulisse S, D'armiento M. Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocr Rev.* 1995;16:443-59.
18. Canale D, Agostini M, Giorgilli G, Caglieresi C, Scartabelli G, Nardini V, et al. Thyroid hormone receptors in neonatal, prepubertal, and adult rat testis. *J Androl.* 2001;22:284-8.
19. Nunes MT. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47:639-43.
20. Jannini EA, Olivieri M, Francavilla S, Gulino A, Ziparo E, D'armiento M. Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'- triiodothyronine receptor in the rat testis. *Endocrinology.* 1990;126:2521-6.
21. Palmero S, Benahmed M, Morera AM, Trucchi P, Fugassa E. Identification of nuclear triiodothyronine receptors in Sertoli cells from immature piglet testes. *J Mol Endocrinol.* 1992;9:55-9.
22. Jannini EA, Crescenzi A, Rucci N, Screponi E, Carosa E, Matteis A, et al. Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3453-7.

23. Krishnamurthy H, Danilovich N, Morales CR, Sairam MR. Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. *Biol Reprod.* 2000;62:1146-59.
24. Cooke PS, Meisami E. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology.* 1991;129:237-43.
25. Van Haaster LH, De Jong FH, Docter R, De Rooij DG. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology.* 1992;131:1574-6.
26. Hess RA, Cooke PS, Bunick D, Kirby JB. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology.* 1993;132:2607-13.
27. Joyce KL, Porcelli J, Cooke PS. Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *J Androl.* 1993;14:448-55.
28. Teerds KJ, Rooij DG, Jong FH, Van Haaster LH. Development of the adult-type leydig cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels. *Biol Reprod.* 1998;59:344-50.
29. França LR, Hess RA, Cooke PS. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec.* 1995;242:57-69.
30. Miranda JR. Regulação da proliferação pós-natal das células de sertoli em ratos [tese]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.
31. Bunick D, Kirby J, Hess RA, Cooke PS. Developmental expression of testis messenger ribonucleic acids in the rat following propylthiouracil-induced neonatal hypothyroidism. *Biol Reprod.* 1994;51:706-13.
32. Chiao Y, Lin H, Wang S, Wang PS. Direct effects of propylthiouracil on testosterone secretion in rat testicular interstitial cells. *Br J Pharmacol.* 2000;130:1477-82.
33. Auharek SA, França LR. Postnatal testis development, sertoli cell proliferation and number of different spermatogonial types in C57BL/6J mice made transiently hypo- and hyperthyroidic during the neonatal period. *J Anat.* 2010;216:577-88.
34. Kirby JD, Mankar MV, Hardesty D, Kreider DL. Effects of transient prepubertal 6-N-propyl-2-thiouracil treatment on testis development and function in the domestic fowl. *Biol Reprod.* 1996;55:910-6.
35. Matta SLP, Vilela DAR, Godinho HP, França LR. The Goitrogen 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU) given during testis development increases sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology.* 2002;143:970-8.

36. Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB, Manen KRTV, Haupt RL. Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biol Reprod.* 1998;59:351-7.
37. El Shennawy A, Gates RJ, Russell LD. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: cell viability after hormonal replacement in adults after intermediate periods of hypophysectomy. *J Androl.* 1998;19:320-34.
38. Wajner SM, Wagner MS, Fernandes NS, Maia AL. O papel dos hormônios tireoidianos na função testicular. *Rev HCPA.* 2008;28:41-8.
39. Silva Jr VA. Efeitos da indução do hipotireoidismo e hipertireoidismo pós-natal na proliferação das células de Sertoli e na função testicular em suínos [tese]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; 2000.
40. Kala N, Ravisankar B, Govindarajulu P, Aruldas MM. Impact of foetal-onset hypothyroidism on the epididymis of mature rats. *Int J Androl.* 2002;25:139-48.
41. Anbalagan J, Sashi AM, Vengatesh G, Stanley JA, Neelamohan R, Aruldas MM. Mechanism underlying transient gestational-onset hypothyroidism-induced impairment of posttesticular sperm maturation in adult rats. *Fertil Steril.* 2010;93:2491-7.
42. Jiang J, Umezu M, Sato E. Characteristics of infertility and the improvement of fertility by thyroxine treatment in adult male hypothyroid rdw rats. *Biol Reprod.* 2000;63:1637-41.
43. Wilson MJ, Kirby JD, Yi-Dong ZY, Sinha AA, Cooke PS. Neonatal hypothyroidism alters the pattern of prostatic growth and differentiation, as well as plasminogen activator and metalloprotease expression, in the rat. *Biol Reprod.* 1997;56:475-82.
44. Cordeiro RS. Expressão de receptores androgênicos no lóbulo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2007.
45. Hsieh M, Juang H. Cell growth effects of triiodothyronine and expression of thyroid hormone receptor in prostate carcinoma cells. *J Androl.* 2005;26:422-8.
46. Zhang S, Hsieh M, Zhu W, Klee GG, Tindall DJ, Young CYF. Interactive effects of triiodothyronine and androgens on prostate cell growth and gene expression. *Endocrinology.* 1999;140:1665-71.
47. Lehrer S, Diamond EJ, Stone NN, Droller MJ, Stock RG. Serum triiodothyronine is increased in men with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 2002;168:2431-3.

Recebido em: 27/10/11

Aceito em: 13/07/12

CONSIDERAÇÕES SOBRE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

Aline Silva Rocha¹

Leandro Maia²

Mydian Daroz Guastali¹

Rodrigo Volpato³

Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga⁴

RESUMO

As células-tronco embrionárias são células pluripotentes obtidas da massa celular interna do blastocisto. Em razão de sua grande plasticidade, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar o potencial terapêutico deste tipo celular e os resultados têm sido bastante promissores. Neste sentido, o objetivo desta revisão é abordar aspectos relacionados ao isolamento, cultivo, caracterização e aplicação terapêutica das células-tronco embrionárias de mamíferos.

Palavras-chave: células-tronco embrionárias, blastocisto, terapia celular.

CONSIDERATIONS OF EMBRYONIC STEM CELLS

ABSTRACT

The embryonic stem cells are pluripotent lines derived from inner cell mass of developing blastocysts. Because of its great plasticity, many studies have been done to evaluate the therapeutic potential of the stem cells, and have shown very promising results. The present study has the focus to do a literature review about the isolation, cultivate, characterization and therapeutic application of mammals embryonic stem cells.

Keywords: embryonic stem cells, blastocyst, cellular therapy

CONSIDERACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

RESUMEN

Las células madre embrionarias son células pluripotenciales derivadas de la masa celular interna del blastocito. Debido a su gran plasticidad, muchos estudios se han realizado para evaluar el potencial terapéutico de este tipo de células y los resultados son prometedores. En este sentido, el propósito de esta revisión es para tratar temas relacionados con el aislamiento, cultivo, caracterización y aplicación terapéutica de las células madre embrionarias de los mamíferos.

Palabras clave: células madre embrionarias, blastocito, terapia celular

¹ Mestranda do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu.

Distrito de Rubião Junior s/n, Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, CEP: 18618-000. Botucatu/SP. Fone/Fax: (014) 3811-6249. aline-srocha@hotmail.com

² Doutorando do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu

³ Doutorando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu

⁴ Docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu

INTRODUÇÃO

As células-tronco embrionárias (CTE) são derivadas da massa celular interna do blastocisto e podem ser expandidas em cultura sem que ocorra perda da potencialidade e da capacidade de autorrenovação, desde que sejam utilizados fatores que impeçam sua diferenciação. Estas células podem, ainda, se diferenciar em diversos tipos celulares de acordo com as condições de cultivo. Em ausência de fatores tróficos, as CTE podem se diferenciar em todos os tipos de tecidos, inclusive em células germinativas, de forma espontânea. Diversos tipos celulares são obtidos dessas culturas, incluindo cardiomiócitos, condrócitos, adipócitos, células endoteliais, osteócitos, neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, epitélio alveolar, hepatócitos e ilhotas pancreáticas (1, 2).

Os estudos desenvolvidos a partir das células-tronco têm favorecido um enorme progresso na medicina regenerativa, que consiste na utilização de células, fatores de proliferação e diferenciação celulares e biomateriais que permitem ao próprio organismo reparar tecidos e órgãos lesionados (3).

As CTE têm potencial para serem aplicadas em uma ampla variedade de enfermidades e também podem ser a melhor fonte de tecido humano para o teste de novas drogas *in vitro* (4). Entretanto, os métodos de diferenciação empregados até o momento não produzem populações com 100% de pureza em termos de maturação. Este fato prejudica a utilização clínica dessas células, visto que células indiferenciadas ou comprometidas com mais de uma linhagem celular podem levar a formação de teratomas (tumores embrionários). Outro obstáculo é representado pela imunorreatividade dessas células, que podem ser rejeitadas pelo hospedeiro, necessitando da utilização de terapias imunossupressoras concomitantes (1, 2, 5).

O objetivo desta revisão é abordar aspectos relacionados ao isolamento, cultivo, caracterização e aplicação terapêutica das células-tronco embrionárias em mamíferos.

REVISÃO DE LITERATURA

1. CONCEITO DE CÉLULAS-TRONCO (CT)

As CT são células indiferenciadas que apresentam como características: capacidade de proliferação ilimitada, autorrenovação, produção de diferentes linhagens celulares e regeneração de tecidos (3).

A proliferação das CT ocorre por meio de mitoses sendo responsável por garantir um número adequado de células-tronco em determinado local do organismo, em um momento específico de seu desenvolvimento (3).

A autorrenovação é o processo pelo qual as CT geram cópias idênticas de si mesmas por meio de sucessivas mitoses, o que significa que o organismo mantém um “estoque” permanente deste tipo celular (6).

A diferenciação é a capacidade que as CT apresentam de gerar tipos celulares distintos. Não se sabe exatamente como isso ocorre, mas é possível afirmar que o processo de diferenciação é regulado pela expressão preferencial de genes específicos nas CT (6).

A regeneração de tecidos ocorre quando as CT presentes em diversos locais do organismo recebem sinais específicos para se dividirem e reporem as células perdidas se houver lesão tecidual.

Em virtude dessas propriedades peculiares das CT, muitos cientistas buscam a possibilidade de encontrar a cura para diversas enfermidades por meio da substituição dos tecidos danificados por grupos de CT (7).

2. CLASSIFICAÇÕES DAS CÉLULAS-TRONCO

De acordo com a potencialidade, ou seja, a capacidade de uma célula originar novos tipos celulares, as CT podem ser classificadas conforme descrito abaixo:

⇒ **Totipotentes:** capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extraembrionários. Ex: zigoto, células embrionárias na fase de mórula (8).

⇒ **Pluripotentes:** capacidade de diferenciação em células pertencentes aos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma, assim como as células germinativas primordiais (CGP). Ex: células embrionárias derivadas da massa interna do blastocisto (8).

⇒ **Multipotentes:** diferenciação limitada a determinados tipos celulares. Ex: células em estágio posterior ao desenvolvimento fetal e que persistem após o nascimento (9).

⇒ **Unipotentes:** capacidade de gerar um único tipo de tecido. Ex: células da camada germinativa da epiderme, eritroblastos, espermatogônias dos testículos (9).

Por outro lado, as CT também podem ser classificadas de acordo com a origem:

⇒ **Embrionárias:** obtidas nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, a partir da massa interna do blastocisto (10).

⇒ **Adultas:** isoladas de órgãos e tecidos diferenciados, como: medula óssea, sangue (periférico ou de cordão umbilical), retina, córnea, cérebro, músculos esqueléticos, polpa dental, fígado, pele, tecido adiposo, epitélio gastrointestinal e pâncreas (11).

3. CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS (CTE)

3.1. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Após a penetração do espermatozóide, o óvulo fecundado adquire a condição de zigoto. Durante o trajeto pelo corno uterino, o zigoto sofre sucessivas mitoses resultando em um rápido aumento de suas células, as quais são denominadas blastômeros. Estes continuam a divisão celular formando uma esfera compacta denominada mórula. Neste estágio, os líquidos da cavidade uterina penetram nos espaços entre os blastômeros e duas populações celulares são distinguidas: a massa celular externa (trofoblasto) e a massa celular interna (embrioblasto). Com o aumento do líquido, os espaços se fundem originando uma única cavidade conhecida como blastocele. A partir daí, o conceito passa a ser chamado de blastocisto (12).

As CTE encontram-se na massa celular interna (MCI) do blastocisto e dão origem a todos os tipos celulares, sistemas, tecidos e órgãos do indivíduo em formação. Já as células da massa celular externa (MCE) originam os anexos embrionários (12).

3.2. CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

As CTE têm como principal característica a pluripotência. Isso significa que elas possuem a capacidade de originar qualquer tipo celular do organismo, podendo ser induzidas a iniciar um programa de diferenciação *in vitro* sem perder a pluripotência e a capacidade de autorrenovação, simulando o desenvolvimento normal de um embrião pré-implantado (10, 13, 14).

Em 1981, foram realizados os primeiros cultivos de CT a partir de embriões de camundongos e, desde então, novos cultivos foram conduzidos em ratos, humanos e, mais recentemente, em equinos (15-18).

As análises morfológicas, imunoistoquímicas e moleculares permitem identificar uma grande variedade de linhagens embrionárias na massa celular diferenciada, incluindo as hematopoiéticas, as neuronais, as endoteliais, as cardíacas e as musculares. Desta maneira, as CTE são utilizadas como modelo de desenvolvimento embrionário precoce *in vitro*, o que as

tornam um poderoso instrumento de pesquisa para o estudo dos mecanismos de diferenciação celular e dos efeitos de substâncias tóxicas e biologicamente ativas no desenvolvimento embrionário (15). Por outro lado, o perfil genético das CTE apresenta dados controversos. Apesar de muitos genes terem sido identificados, ainda não há um consenso entre a comunidade científica.

Publicações de diferentes grupos demonstraram que, em uma mesma espécie, linhagens diferentes apresentavam alto grau de heterogeneidade quanto a sua capacidade de diferenciação e expressão gênica, levando a diferentes respostas quando submetidas aos mesmos tratamentos (19, 20). No entanto, de maneira geral, as células pluripotentes apresentam algumas características que indicam tratar-se de uma célula indiferenciada, como: a atividade de fosfatase alcalina, presença do fator de transcrição Oct-4, alta atividade da telomerase e uma variedade de marcadores celulares reconhecidos por anticorpos monoclonais nos antígenos estágio-específicos embrionários (21). As CTE requerem adesão a uma matriz celular ou extracelular para sobrevivência e crescimento (22).

3.3. ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CTE

As células da MCI do blastocisto podem ser isoladas por meio de microcirurgia ou imunocirurgia e transferidas em placas de cultivo previamente preparadas com monocamada de fibroblastos inativados. Tal monocamada de fibroblastos visa o crescimento e sobrevivência das CTE, pois essas requerem adesão a uma matriz celular ou extracelular (22-24).

Geralmente, as CTE são cocultivadas com fibroblastos mitoticamente inativos (Fig.1), mas, metabolicamente ativos, permitindo a síntese estável de receptores e citocinas necessários ao crescimento das CTE. Para esse fim, são utilizadas a inativação química por meio de Mitomicina C ou a inativação por irradiação gama, que inibem a replicação do DNA (25).

A Mitomicina C é um agente quimioterápico que evita a separação da dupla fita de DNA durante a replicação celular por formar ligações covalentes entre as fitas opostas, enquanto a síntese de RNA e de proteínas continua. É capaz de bloquear o ciclo celular em G1, S e G2 enquanto as células permanecem viáveis (26). Já a irradiação gama quebra as fitas de DNA impedindo a duplicação do material genético (27).

Essa camada de fibroblastos inativos contribui com vários fatores essenciais para a manutenção da autorrenovação das CTE, entretanto, a identidade bioquímica desses é desconhecida. Acredita-se que seja um conjunto de fatores de crescimento, moléculas de superfície celular, matriz extracelular e neutralizantes de produtos tóxicos e metabólitos produzidos pelas CTE (28). Por outro lado, pesquisadores identificaram o LIF (Fator inibidor de leucemia) como sendo um fator liberado por fibroblastos embrionários murinos (29).

Fibroblastos secretam promotores da manutenção do estado indiferenciado como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento transformante β (TGF β), activinas, proteínas WNT e antagonistas da sinalização de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP).

No cultivo de CTE humanas, a monocamada de fibroblastos murinos pode ser substituída por células do parênquima da glândula mamária, fibroblastos fetais, células endometriais uterinas, células musculares fetais e epiderme adulta de humanos (29).

O LIF atua em um receptor específico que ativa o transdutor de sinal gp130, o qual atua em duas vias de sinalização intracelular: JAK-STAT e Shp-Erk2 (30). A ativação do fator de transcrição STAT3 é suficiente para a manutenção da pluripotência em relação à via Shp-Erk2. A ativação de STAT3 é essencial para a manutenção da pluripotência, mesmo sem a presença de LIF (31, 32).

As CTE de camundongos podem ser mantidas indiferenciadas quando cultivadas em meio de cultivo com adição do LIF (Fig.2). O efeito do LIF consiste em ativar o fator STAT3

indispensável para a continuação da multiplicação de células indiferenciadas. Possivelmente, os fatores de transcrição Oct-4 e STAT3 interagem afetando a função dos mesmos genes (33, 34).

Estudos preliminares demonstraram que células da MCI de blastocistos bovinos apresentam receptores para LIF. No entanto, a presença da LIF não auxiliou no estabelecimento e manutenção de CTE em outros ungulados (35). De fato, existe um efeito deletério da adição de LIF ao cultivo de CTE em bovinos. Da mesma maneira, outros fatores de crescimento que suprimem a diferenciação de CTE murinas, como o bFGF, EGF e IGFs, não são capazes de inibir a diferenciação de CTE de suíno. Acredita-se que o bFGF atua na fosforilação da tirosina de várias proteínas e ativação da sinalização extracelular das kinases ERK1/2 (36).

Porém, a remoção dos fibroblastos e de LIF e seu cultivo em suspensão podem induzi-las a entrar em um programa de diferenciação *in vitro* de forma sincronizada. Nestas condições, as CTE formam espontaneamente agregados de células diferenciadas chamados “corpos embrióides” (EB=embryoid bodies), simulando o desenvolvimento de um embrião pré-implantado. Nos primeiros dois a quatro dias de cultura em suspensão, observa-se a formação de endoderma na superfície dos agregados de CTE. Após mais alguns dias em cultura, forma-se uma cavidade cística, células do endoderma e ectoderma se desenvolvem e, a seguir, uma série de linhagens embrionárias podem ser caracterizadas, incluindo linhagens hematopoiética, neuronal, endotelial, cardíaca e muscular (37).

Assim, a diferenciação de CTE em cultura em suspensão representa um modelo *in vitro* poderoso para o estudo da determinação das linhagens embrionárias durante o desenvolvimento mamífero. O potencial pluripotente pode ser avaliado *in vitro* pela indução da diferenciação celular. Um método simples de se verificar a diferenciação espontânea é o cultivo por um período superior a sete dias sem que as células sejam replicadas (38). No entanto, a melhor maneira de caracterizar a pluripotência de CTE é a indução de sua diferenciação para linhagens celulares com origem ectodermal, mesodermal e endodermal (39).

Estratégias diferentes têm sido utilizadas para indução da diferenciação *in vitro* das CTE. As CTE se diferenciam espontaneamente em células derivadas das 3 camadas embrionárias: endoderme, mesoderme e ectoderme pela formação dos corpos embrióides. A maior parte dos métodos para diferenciação das CTE utiliza o plaqueamento dos corpos embrióides em placas cobertas de gelatina, na ausência de monocamada de suporte e suplementação com fatores de crescimento e/ou fatores indutores de diferenciação.

É importante ressaltar que a habilidade dos pesquisadores em manipular de maneira eficiente as CTE para diferenciação em células específicas, permitirá a criação de uma fonte ilimitada de células que poderão ser usadas não apenas para o crescimento de tecidos implantáveis, mas também para testar novas drogas para cura de enfermidades e identificar genes com potencial problemático (2, 40, 41).

3.4. MARCADORES DE PLURIPOTÊNCIA DAS CTE

De maneira geral, as células pluripotentes apresentam algumas características que indicam tratar-se de uma célula indiferenciada, como: atividade de fosfatase alcalina, presença do fator de transcrição Oct-4, alta atividade da telomerase e uma variedade de marcadores celulares reconhecidos por anticorpos monoclonais nos antígenos estágio-específicos embrionários (21).

Em embriões de ratos, a pluripotência é mantida primariamente pelos seguintes genes: POU5F1 (denominado de Oct-4), Sox-2 e Nanog. Esses genes são ativados por fatores de transcrição próprios que também se ligam a genes responsáveis em codificar componentes que irão inibir vias essenciais para o desenvolvimento. A expressão de Oct-4 é considerada

um marco fundamental para a identificação de células pluripotentes de rato. O Oct-4 é expresso em células pluripotentes durante as clivagens, na massa celular interna, no epiblasto em início da fase pós-implantação do embrião e em células-tronco embrionárias em cultivo (42, 43).

Apesar de o gene Oct-4 ser necessário para manutenção da pluripotência de CTE em ratos, o mesmo padrão não é apresentado em outras espécies. Genes ortólogos de Oct-4 com alta homologia de sequência, assim como regiões reguladas pela proteína, foram identificadas em várias espécies de mamíferos (44). No entanto, blastocistos humanos em diferentes estágios apresentam diferentes níveis de expressão do Oct-4. Além disso, diferentes laboratórios demonstraram que a proteína Oct-4 é expressa tanto pela MCI como pelo trofotoderma em embriões de ungulados (35).

Por meio da imunistoquímica, a expressão do Oct-4 foi estudada em blastocistos produzidos *in vitro* e *in vivo* nas espécies murina, suína e bovina. Em camundongos, a expressão do Oct-4 foi restrita à MCI, enquanto em suínos (7 dias após a fertilização) e bovinos (8 dias após a fertilização), sua expressão foi observada tanto na MCI quanto no trofotoderma, não havendo diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo*. Esses dados corroboram com a literatura, segundo os quais, houve expressão de Oct-4 na MCI e trofotoderma de blastocistos caprinos produzidos *in vivo*. Concluiu-se, portanto, que existe marcada diferença na regulação do Oct-4 entre camundongos e animais domésticos (45, 46).

Por outro lado, o Nanog parece ser um bom candidato a marcador de pluripotência em ruminantes, pois estudos detectaram o mRNA para o Nanog e a proteína na MCI de embriões de caprinos, sendo que estes estavam fortemente reprimidos no trofotoderma (47). O gene Nanog também tem se mostrado muito importante, pois a ausência de sua transcrição induz a diferenciação celular para linhagens de endoderme extraembrionária, enquanto uma expressão 50 a 60% menor induz a geração de vários tipos de tecidos, ativando genes da endoderme, mesoderme e ectoderme (48). Sua hiperexpressão permite o crescimento em sistemas livres do cocultivo e melhora a eficiência na produção de células clones (49).

O Sox-2 é um fator de transcrição que é essencial para a manutenção de autorrenovação das células do embrião indiferenciado e de células estaminais. Este gene codifica um membro da família de fatores de transcrição envolvidos na regulação do desenvolvimento embrionário e na determinação do destino da célula. A proteína transcricional codificada pode atuar como um ativador após formar um complexo proteico com outras proteínas. O Sox-2 é um dos principais fatores de transcrição exigido em células-tronco com pluripotência induzida. Um grupo de pesquisadores concluiu que o principal papel do Sox-2 em células-tronco pluripotentes é controlar a expressão de Oct-4, sendo que estes genes perpetuam a sua própria expressão, quando expressos espontaneamente (50).

As CTE da espécie equina apresentam marcadores em sua superfície celular como antígeno estágio específico 1 (SSEA-1), além de serem caracterizadas por expressar o fator de transcrição STAT3 e o Oct-4. Esse padrão de expressão difere do encontrado em camundongos e humanos que, por sua vez, também diferem entre si. O gene Oct-4 é considerado essencial na formação da MCI, pluripotência e renovação celular nas três espécies citadas (51).

Apesar de compartilharem similaridades quanto à morfologia e alguns marcadores de superfície celular e de expressão gênica, as CTE possuem características únicas em cada espécie. As CTE murinas apresentam colônias espessas com células sobrepostas e com bordas não definidas, enquanto as células embrionárias humanas e equinas formam colônias de espessura fina e com bordas bem definidas (17).

A morfologia das células, assim como sua capacidade de formar corpos embrióides quando em cultivo, tem sido utilizada como critério para definir linhagens de CTE. Em bovinos, as CTE devem apresentar tamanho pequeno, aspecto arredondado e alto índice núcleo:citoplasma (52). Esta classificação é particularmente importante, pois, com frequência,

ocorre a contaminação do cultivo por células do trofotoderma, bem como por células do endoderma visceral (hipoblasto). Sendo assim, a caracterização de linhagens de CTE de ungulados deve ser acompanhada pela expressão de marcadores específicos para os tipos celulares contaminantes do cultivo, ou seja, transferrina ou α -fetoproteína para detecção de células da endoderme; interferon-tau para detecção de células do trofotoderma de bovinos; citoqueratina para detecção de células da ectoderme, incluindo o trofoblasto. A propagação continuada de linhagens de CTE inapropriadamente caracterizadas pode induzir os pesquisadores ao erro e, dessa forma, prejudicar a descoberta de condições de cultivo mais adequadas ao cultivo de verdadeiras CTE (35).

Como os marcadores convencionais de pluripotência têm se demonstrado inespecíficos em outros ungulados, é importante a utilização de outros métodos que confirmem a origem embrionária das células em cultivo (52).

A pluripotência das CTE pode ser avaliada pela administração intraperitoneal ou subcutânea dessas células indiferenciadas em camundongos imunossuprimidos (*SCID mice*) resultando na formação de teratomas. Em suínos, teratomas foram pouco observados (53, 54).

3.5. APLICAÇÃO TERAPÊUTICA

O princípio da terapia celular consiste em restaurar a função de um órgão ou tecido com a substituição das células perdidas por uma enfermidade ou substituir células que não funcionam adequadamente devido a um defeito genético, vascular ou iatrogênico (3).

A aplicação das CT na reconstituição de tecidos não reparáveis cresce de forma marcante. Enfermidades dos sistemas hematológico (leucemias, linfomas), nervoso (acidente vascular cerebral, esclerose múltipla, traumatismo raquimedular) e cardiovascular (infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca) são alvos naturais de interesse (55).

Recentemente, testaram a aplicação de CTE e CTM (células-tronco mesenquimais) para tratamento de tendinite no tendão do músculo flexor digital superficial de equinos. Os resultados revelaram que as CTE apresentaram taxa de sobrevida maior que as CTM, sendo encontradas em todas as áreas de injúria tecidual, diferentemente das CTM, que apenas se mantiveram no local onde foram injetadas. Ainda, durante os 90 dias de realização do experimento, as CTE não induziram resposta imune ou formação de tumores no local de aplicação (56).

As CTE apresentam evidente potencial de aplicação em diversas áreas da medicina, uma vez que são capazes de originar todas as células de um indivíduo adulto. Porém, por questões éticas e de biossegurança, o uso das CTE para fins terapêuticos ainda encontra-se limitado (55).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos sobre CTE têm gerado grandes expectativas na área da saúde. Entretanto, considerações de ordem ética, religiosa, moral, legal e econômica são inevitáveis e geram uma grande polêmica no que diz respeito à obtenção dessas células.

O desenvolvimento biotecnológico alcançado poderá permitir que muitas enfermidades consideradas incuráveis até a ocasião, possam ser tratadas com as células-tronco embrionárias permitindo uma perspectiva de vida melhor para muitos pacientes. Porém, os resultados ainda são preliminares tornando-se necessária muita cautela na execução e divulgação de novos resultados, particularmente, para fins terapêuticos.

REFERÊNCIAS

1. Araújo JD, Araújo Filho JD, Ciorlin E, Ruiz M, Ruiz LP, Greco OT, et al. A terapia celular no tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores. *J Vasc Bras*. 2005;4:357-65.
2. National Institutes of Health. Stem cells: a primer. Bethesda, Maryland; 2011 [cited 2011 Nov 15]. Available from: <http://www.travisroyfoundation.org/pages/PDF/NIH-stemcells.pdf>.
3. Oliveira GK. Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão [dissertação]. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria; 2008.
4. Schwindt TT, Barnabé GF, Mello L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *J Bras Neurocir*. 2005;16:13-9.
5. Bydlowski SP, Debes AA, Duarte AS, Janz FL, Cavaglieri RC, Maselli LMF. Células-tronco do líquido amniótico. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31:45-52.
6. Braga FHP, Bonomo A. Células-tronco e câncer: vida e morte com uma origem comum? Campinas; 2011 [acesso em 2011 Nov 22]. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/celulas/13.html>.
7. Souza MH, Elias DO. As células-tronco e o seu potencial na reparação de órgãos e tecidos. In: Manual de instrução programada: princípios de hematologia e hemoterapia. 2ª ed. 2005 [acesso em 2011 Nov 20]. Disponível em: <http://perflin.com/cear/artigos /stem.pdf>.
8. Benjamin ER, Martin FP, Chui-Yee F, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*. 2000;18:399-404.
9. Fibbe WE. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:29-31.
10. Riveros DM, Chagoyán JCV, Morales RA, Juárez MC. Células madre y células troncoembrionarias: diferencias biológicas. *Vet Mex*. 2007;38:477-501.
11. Gomes D. Células-tronco embrionárias: implicações bioéticas e jurídicas. *Bioethikos*. 2007;1:78-87.
12. Ramírez PH, Balea ED. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Rev Cuba Hematol*. 2004;20:1-17.
13. Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen*. 2001;9:429-42.
14. Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7:862-9.
15. Pereira LV. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. *Cienc Saude Coletiva*. 2008;13:7-14.

16. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-7.
17. Li X, Zhou SG, Imreh MP, Allen WR. Horse embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass cells. *Stem Cells Dev*. 2006;15:523-53.
18. Taylor SE, Smith RKW, Clegg PD. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J*. 2007;39:172-80.
19. Hoffman LM, Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2005;23:699-708.
20. Allegrucci C, Young LE. Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod Update*. 2007;13:103-20.
21. Donovan JP, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. 2001;414:399-405.
22. Nieto A, Cabrera CM, Catalina P, Cobo F, Barnie A, Cortés JL, et al. Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as feeders in human embryonic stem cells: Immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry. *Cell Biol Int*. 2007;31:269-78.
23. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg*. 2005;34:415-23.
24. Koch TG, Lise CB, Betts DH. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can Vet J*. 2008;49:1009-17.
25. Roy A, Krzykwa E, Lemieux R, Néron S. Increased efficiency of gamma-irradiated versus mitomycin C-treated feeder cells for the expansion of normal human cells in long-term cultures. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001;10:873-80.
26. Tomasz M, Lipman R, Chowdary D, Pawlak J, Verdine GL, Nakanishi K. Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science*. 1987;235:7212-20.
27. Malinowski K, Pullis C, Raisbeck AP, Rapaport FT. Modulation of human lymphocyte marker expression by gamma irradiation and mitomycin C. *Cell Immunol*. 1992;143:368-77.
28. Pedersen RA. Feeding hungry stem cells. *Nature*. 2002;20:882-3.
29. Unger C, Skottman H, Blomberg P, Sirac DM, Hovatta O. Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Hum Mol Genet*. 2008;17:48-53.
30. Friel E, Sar S, Mee JP. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57:1894-903.

31. Minami M, Inoue M, Wei S, Takeda K, Matsumoto M, Kishimoto T, et al. STAT 3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid leukemia cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:3963-6.
32. Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, et al. STAT 3 activation is sufficient to maintain na undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*.1999;18:4261-9.
33. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*. 1998;12:2048-60.
34. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000;24:372-6.
35. Keefer CL, Pant D, Blomberg L, Talbot NC. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Anim Reprod Sci*. 2007;98:147-68.
36. Veljsted M, Du Y, Vatja G, Maddox-Hyttel P. Post-hatching development of the porcine and bovine embryos-defining criteria for expected development in vivo and in vitro. *Theriogenology*. 2006;65:153-65.
37. Ling V, Neben S. In vitro differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. *J Cell Physiol*. 1997;171:104-15.
38. Heins N, Englund MCO, Sjoblom C, Dahl U, Tønning A, Bergh C, et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2004;22:367-76.
39. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:5709-12.
40. Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27:6052-63.
41. Cortesini R. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation. *Transpl Immunol*. 2005;15:81-9.
42. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*. 2004;350:1353-6.
43. Pesce M, Scholer HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*. 2001;19:271-8.
44. Nordhoff V, Hubner K, Bauer A, Orlova I, Malapesta A, Scholer HR. Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamm Genome*. 2001;12:309-17.

45. Kirchof NJW, Carnwath E, Lemme K, Anastassiadis H, Schöler HN, Niemann H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod.* 2000;63:1698-705.
46. He S, Pant D, Schiffmacher A, Bischoff S, Melican D, Gavin W, et al. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of nanog protein localization in the nucleolus. *Mol Reprod Dev.* 2006;73:1512-22.
47. Bhattacharya B, Miura T, Brandenberger R, Mejido J, Luo YAX, Joshi BH, et al. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood.* 2004;103:2956-64.
48. Hatano S, Tada M, Kimura H, Yamaguchi S, Kono T, Nakano T, et al. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech Dev.* 2005;122:67-79.
49. Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development.* 2006;133:1193-201.
50. Masui S. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9:625-35.
51. Saito S, Ugai H, Sawai K, Yamamoto Y. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. *FEBS Lett.* 2002;531:389-96.
52. Muñoz M, Rodríguez C, De Frutos C, Caamaño JN, Díez C, Facal N, et al. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. *Theriogenology.* 2008;69:1159-64.
53. Lin T, Chao C, Saito S, Mazur S, Murphy M, Appella E, et al. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol.* 2004;7:165-71.
54. Brevini TAL, Tosetti V, Crestan M, Antonini S, Gandolfi F. Derivation and characterization of pluripotent cell lines from pig embryos of different origins. *Theriogenology.* 2007;67:54-63.
55. Okamoto OK, Holthausen AC. Perspectivas em terapia celular: células-tronco. *Einstein.* 2004;2:355-8.
56. Diniz D, Avelino D. Cenário internacional da pesquisa em células-tronco embrionárias. *Rev Saude Publica.* 2009;43:541-7.

Recebido em: 05/12/11

Aceito em: 25/07/12

HIDRANENCEFALIA EM FETO EQUINO – RELATO DE CASO

Carolina Nogueira de Moraes^{1*}

Leandro Maia²

Bruna Busianov Zaharov Simon³

Luana de Cássia Bicudo¹

Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva¹

Isabelle Rayanne Sousa de Oliveira¹

Cezinande Meira⁴

RESUMO

A hidranencefalia em equinos é considerada rara, mas é relatada em outras espécies. É caracterizado como um processo de destruição dos lóbulos cerebrais que pode ser causada em decorrência da infecção viral intrauterina ou por alterações na vascularização uterina. Os relatos a respeito de tal patologia são escassos e por tal, o presente trabalho tem por objetivo a descrição de um caso de hidranencefalia em feto equino.

Palavras-chave: equino, hidranencefalia, distocia

HYDRANENCEPHALY IN EQUINE FETUS - CASE REPORT

ABSTRACT

The hydranencephaly in horses is rare, but is described in other species. It is characterized as a process of destruction of the brain lobes that may be caused as a result of intrauterine viral infection or caused by changes in the uterine vasculature. The reports about this disease are scarce and as such, this paper aims at describing a case of hydranencephaly in equine fetus.

Keywords: horse, hydranencephaly, dystocia

HIDRANENCEFALIA EN EL FETO EQUINO - CASO CLÍNICO

RESUMEN

Aunque ha sido descrita en otras especies, la hidranencefalia en caballos es un padecimiento raro, Esta anomalía se caracteriza por un proceso de destrucción de los lóbulos del cerebelo que puede ser provocado por infección viral intrauterina o por cambios vasculares uterinos. Los reportes acerca de esta enfermedad son escasos. Así, este trabajo tiene como objetivo describir la presencia de hidranencefalia en un feto equino.

Palabras clave: caballo, hidranencefalia, distocia

¹ Residente do Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

* Carolina Nogueira de Moraes - Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – Botucatu /SP. 14- 38116249. carolnmoraes@hotmail.com

² Aluno de Doutorado do Depto de Clínica de Grandes Animais. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970, Botucatu/SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Univ Estadual Paulista, Departamento de Clínica de Grande Animais.

³ Aluna de Graduação de Medicina Veterinária. Rua Dr. Almeida Lima, 1134, CEP 03164000 Universidade Anhembí Morumbi- Campus Centro – Mooca/SP.

⁴ Professor Adjunto do Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970, Botucatu/SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Univ Estadual Paulista, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

INTRODUÇÃO

A hidranencefalia, já descrita em várias espécies, é um tipo de hidrocefalia compensatória (normotensiva) que desenvolve normalmente em decorrência de infecção viral ou por outro agente infeccioso uterino como, por exemplo, os da família arbovírus. O líquido cefalorraquidiano fica retido em locais onde o tecido cerebral tenha sido lesionado ou inflamado, e normalmente não há aumento na pressão do líquido cefalorraquidiano (1, 2).

A ocorrência dessa enfermidade em equinos é considerada escassa, havendo raros relatos (2) e informações sobre a sua fisiopatologia na literatura. Desta forma, o objetivo deste trabalho é relatar um caso de hidranencefalia em potro associada à distocia.

RELATO DE CASO

Uma égua mestiça, com aproximadamente 12 anos foi encaminhada ao Hospital Veterinário da FMVZ (UNESP, campus de Botucatu), com histórico de parto distócico.

À anamnese, constatou-se que a fêmea estava com 270 dias de gestação e era receptora em um programa de transferência de embriões. Foi informado que na manhã do atendimento, o animal sem sinais de dor, apresentou exposição de placenta, com presença de contrações abdominais e tentativas de expulsão fetal, porém sem sucesso. Foi relatado ainda que nenhuma medicação, que pudesse justificar o abortamento, fora administrada ao animal.

Ao exame físico, os parâmetros vitais encontravam-se dentro da normalidade estabelecida para a espécie e o animal estava alerta, com sinais evidentes de desconforto abdominal e incômodo à palpação vaginal.

À inspeção vaginal e vulvar não havia alterações e a cérvix encontrava-se aberta, o que possibilitou a avaliação fetal pela via vaginal. Com o animal em posição quadrupedal, contido em tronco de contenção, após devida higienização e lubrificação procedeu-se o exame obstétrico manual pela via vaginal, no qual se constatou ausência de viabilidade fetal e aumento da cabeça do feto, com áreas de flutuação e rigidez à palpação.

Devido ao elevado custo para realização da cesariana e inviabilidade fetal, optou-se por tentativa de realização da fetotomia, tendo a eutanásia como uma alternativa no caso de insucesso da técnica.

A égua foi primeiramente tranquilizada com detomidina (0,005mg/Kg IV) e durante o procedimento foi administrado tartarato de butorfanol (0,004mg/Kg IV) para analgesia. Procedeu-se então abundante lubrificação com carboximetilcelulose e realização da fetotomia parcial com fetótomo modelo Thygesen e fio serra de aço (Liess), por meio da realização de único corte na altura atlanto-occipital, sendo o segmento cranial removido. Em seguida, o feto foi traçado com auxílio de correntes obstétricas.

O diagnóstico de hidranencefalia fetal foi conduzido após avaliação macroscópica do crânio seccionado. Desta forma, evidenciou-se ausência dos hemisférios cerebrais, além de uma fina membrana que possivelmente servia para alojar o líquido cefalorraquidiano (Figura 1) que extravasou durante a fetotomia. Adicionalmente, alterações na região cervical, torácica, abdominal e nos membros não foram observadas, conforme demonstrado na Figura 2.

Após a fetotomia foi realizada lavagem uterina por nove dias com auxílio de uma sonda, utilizando-se água destilada aquecida, acrescida de 3 mL de solução de digluconato de clorexidina alcoólica (0,5%) e administração de duas aplicações de pentabiótico (30000UI/kg IM) com intervalo de 24 horas. Após avaliação e certificação de ausência de comprometimento reprodutivo, a égua recebeu alta e retornou a propriedade.

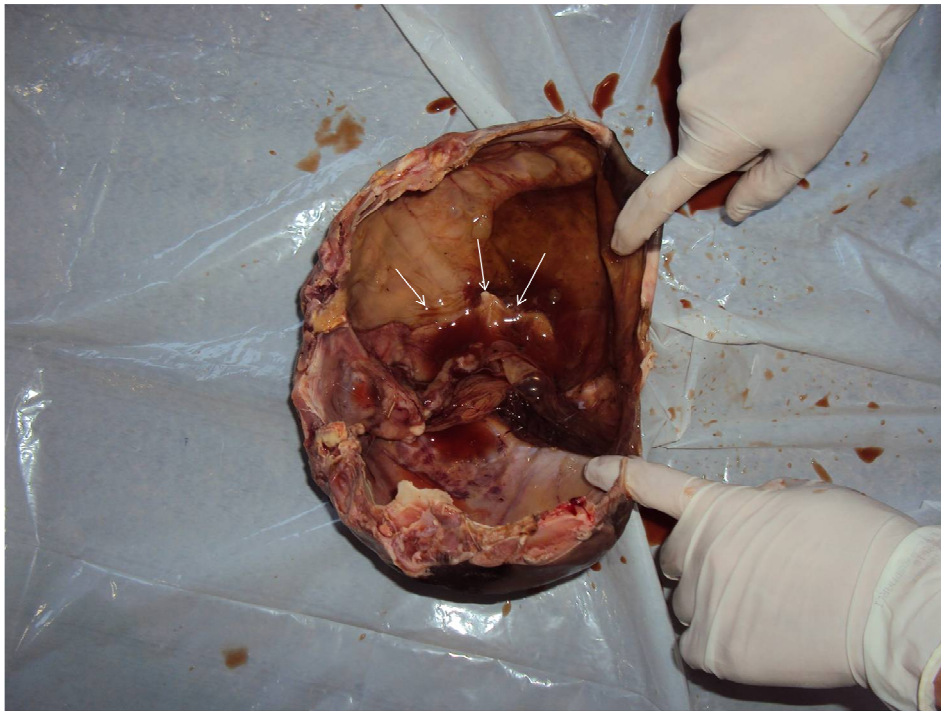


Figura 1. Corte transversal do crânio do feto equino. Nota-se ausência dos hemisférios cerebrais, além de uma fina membrana (setas) que possivelmente servia para alojar o líquido cefalorraquidiano.



Figura 2: Feto equino de 270 dias com hidranencefalia. Nota-se ausência de má formações em outras regiões, incluindo pescoço, tórax, abdômen e membros pélvicos e torácicos.

DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme revisado por Baiker et al. (2), casos de hidranencefalia são descritos em humanos, gatos, cordeiros e bovinos, sendo que em humanos a etiologia pode estar relacionada à isquemia durante a gestação, e em ruminantes à infecções virais no primeiro ou começo do segundo trimestre de gestação por arbovirus, parvovirus ou pestivirus. Quando a

infecção ocorre no início da gestação, pode sobrevir abortamento e no final, desenvolvimento normal do sistema nervoso central, ou formação de pequenas cavidades císticas (porencefalia). Ainda, em cordeiros a hidranencefalia pode estar relacionada à deficiência de cobre.

No presente caso, por meio da palpação pela via vaginal, evidenciou-se anomalia fetal, com impossibilidade de parto eutócico, optando-se pela realização da fetotomia parcial. Apenas um corte na região atlanto-occipital foi necessário para completa liberação do restante do feto, e foi dada especial atenção no momento da tração fetal para evitar que a porção óssea seccionada lacerasse o trato genital da fêmea.

Em estudo para investigar e classificar as malformações intracranianas em ovinos por inoculação viral, Barlow (3) identificou que nos casos de hidranencefalia, os lóbulos cerebrais ou a maior parte do cérebro eram representados por uma bolsa líquida flutuante envolta por uma fina membrana, composta histologicamente de elementos residuais corticais e das células da glia, ligada às meninges que frequentemente colapsavam após remoção do calvário. Os animais com hidranencefalia apresentavam hipoplasia ou displasia cerebelar, cabeça normal, sem sinais de tremores musculares. No presente relato, o diagnóstico de hidranencefalia deu-se após avaliação do crânio do feto, no qual evidenciou-se ausência de massa encefálica e presença de uma fina membrana, conforme já relatado por Barlow (3). De diferente modo, em um caso de hidranencefalia por etiologia vascular em potro prematuro, os hemisférios cerebrais estavam presentes, porém apresentavam assimetria, tamanho reduzidos e continham grande quantidade de fluido (2).

No presente caso, embora o diagnóstico de hidranencefalia tenha sido determinado pela macroscopia, a etiologia do processo não foi investigada por exames laboratoriais (isolamento viral e sorologia). Todavia, com base nos achados necroscópicos e etiologia já relatada em ruminantes (3), a hipótese de infecção viral no presente caso é plausível e deve ser investigada na ocorrência de novos casos na espécie equina.

REFERÊNCIAS

1. Andrews FM. Cerebrospinal fluid evaluation. In: Reed SM, Bayly WM. Equine internal medicine. Philadelphia: Saunders; 1998. p.434-6.
2. Baiker K, Saunders N, Summers BA, Piercy RJ, Smith K. Hydranencephaly in a foal. Equine Vet Educ. 2010;22:593-8.
3. Barlow RM. Morphogenesis of hydranencephaly and other intracranial malformations in progeny of pregnant ewes infected with pestiviruses. J Comp Pathol. 1980;90:87-98.

Recebido em: 16/12/11

Aceito em: 28/05/12

DERMATOMIOSITE CANINA FAMILIAR- *SIMILE*: RELATO DE CASO

Juliana Odagui¹
Claudio Nazaretian Rossi¹
Carlos Eduardo Larsson Jr¹
Nilceo Schweri Michalany²
Carlos Eduardo Larsson³

RESUMO

Dermatomiosite canina familiar-*simile* é afecção caracterizada pelo comprometimento da pele, musculatura estriada e vasos sanguíneos, sem envolvimento genético. O presente relato descreve o diagnóstico clínico e histopatológico, e avalia a eficácia do tratamento com pentoxifilina e prednisona em um cão acometido por tal enfermidade.

Palavras-chave: isquemia, pentoxifilina, cães

CANINE FAMILIAL DERMATOMYOSITIS-*SIMILE*: CASE REPORT**ABSTRACT**

Canine familial dermatomyositis-*simile* is characterized by involvement of the skin, striated muscles and blood vessels, with no involvement genetic. This report describes the clinical and histopathological diagnosis, and evaluates the effectiveness of treatment with pentoxifylline and prednisone in a dog affected by this disease.

Keywords: ischemia, pentoxifylline, dogs

DERMATOMIOSITIS CANINA FAMILIAR – SÍMIL: REPORTE DE CASO**RESUMEN**

La dermatomiositis se caracteriza por el deterioro de la piel, los músculos estriados y los vasos sanguíneos, sin basis genética. Este reporte describe el diagnóstico clínico e histopatológico, y evalúa la eficacia del tratamiento con pentoxifilina y prednisona en un perro afectado por esta enfermedad.

Palabras clave: isquemia, pentoxifilina, perros

Dermatomiosite constitui-se em enfermidade inflamatória cutânea e miovascular (1, 2) de natureza autoimune que acomete as espécies canina e humana (3).

A dermatomiosite canina familiar (DCF) constitui-se em genodermatose, autossômica dominante de expressividade variável, descrita em Collie e Pastor de Shetland, pela primeira vez, respectivamente, em 1984 e 1985 (4).

Já a variante DCF-*simile* pode acometer quaisquer outras raças, compartilhando aspectos clínicos e histopatológicos com aqueles da DCF (3), destarte sem comprovação de envolvimento genético (5). Há relatos ocasionais de DCF-*simile* em pacientes das raças

¹ Universidade de São Paulo (USP) - Departamento de Clínica Veterinária

² Laboratório Paulista de Dermatopatologia

³ Universidade de São Paulo (USP) - Departamento de Clínica Veterinária

Chow-Chow, Welsh Corgi, Pastor Alemão, Kuvasz, Schnauzer miniatura, Dachshund e Fox Terrier, além de cães sem precisa definição racial (3).

A etiopatogenia da dermatomiosite em cães e em humanos é basicamente desconhecida (3-6). Em cães foi aventada patogenia autoimune, devido às anormalidades imune detectáveis, bem como, pressupôs-se poder ser induzida por fármacos, infecções (sobretudo as virais), toxinas ou, ainda, como manifestação paraneoplásica (7, 8). Normalmente, os sinais da DCF estão relacionados a evento eliciador, como estro, parto, lactação, trauma ou a exposição excessiva ao sol (7, 8).

As lesões são caracterizadas como áreas focais de crostas e descamação que se instalam, comumente, na face, ponta de orelha e da cauda e em proeminências ósseas de extremidades distais. Com a progressão da enfermidade, as crostas se tornam mais evidentes e ocorre o assentamento de eritema e alopecia (3).

Embora as lesões musculares sejam raras, quando presentes, representam a forma clínica mais agressiva da dermatomiosite, evidenciado pela dificuldade de deglutição, redução do reflexo do vômito e hipermetria (3). Em geral, Pastores de Shetland apresentam maior comprometimento cutâneo, enquanto que os Collies são mais predispostos a desenvolver a miosite, além da dermatopatia (1).

O diagnóstico definitivo é obtido por exame histopatológico, cujos locais de eleição para se obter os fragmentos cutâneos, por biópsia, são aqueles correspondentes a lesões alopécicas e eritematosas (4).

Um cão, sem precisa definição racial, fêmea, com três anos de idade, foi inicialmente atendido no Serviço de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica e do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, apresentando histórico de quadro lesional tegumentar iniciado antes dos 12 meses de idade, com prurido de moderada intensidade e mialgia de ocorrência esporádica.

Ao exame físico evidenciou-se presença de crostas hemáticas encimando áreas de erosão, fissura, alopecia, descamação, eritema e, por vezes, de leucodermia, localizadas em extremidades distal de cauda e membros, em pavilhão auricular, e em regiões cefálica e cervical ventral (Figuras 1.A; B).

Foram realizados, como exames complementares: parasitológico de raspado cutâneo, interposição da Luz de Wood, citologia tegumentar, cultivo micológico, hemograma, glicemia, perfis renal e hepático, cujos resultados apresentavam-se dentro da normalidade; e, por fim, histopatológico de lesões tegumentares. O exame de urina tipo I, incluído no perfil renal, também apresentou-se sem alterações.

A avaliação histopatológica revelou, na camada córnea, intensa paraqueratose, presença de grau variável de degeneração vacuolar em células da camada basal. Dilatação dos vasos sanguíneos, com infiltração linfocitária perivascular e melanófagos, plenos de pigmento melânico, foram observados na derme papilar e reticular superficial. Evidenciou-se, também, espessamento da membrana basal e redução do número de folículos pilosos.

Após estabelecido o diagnóstico de dermatomiosite, foi instituído politerapia com pentoxifilina (25 mg/Kg/BID) e prednisona, na dose de 2 mg/kg, uma vez ao dia, durante seis semanas, ocorrendo melhora parcial do quadro dermatológico e resolução total da mialgia. Optou-se, então, pela redução gradual da dosagem do glicocorticóide, sem retirá-lo completamente, para que se mantivessem estabilizadas as lesões tegumentares.

DCF-*simile* é clinicamente similar à DCF, porém sem predisposição racial e familiar conhecida. Ambas as formas se desenvolvem, exclusivamente, em animais jovens, ao contrário de outras dermatopatias isquêmicas, como a paniculite pós-vacinal, dermatopatias isquêmicas generalizada idiopática e pós-vacinal (4). O animal não apresentava precisa definição racial e desenvolveu as alterações tegumentares em faixa etária inferior a doze meses de idade, de forma similar ao já observado por outros autores (4).



Figura 1. A. (Fonte: Serviço de Dermatologia – HOVET/USP): Áreas de alopecia focal cefálica em regiões de plano nasal e frontal.



Figura 1. B. (Fonte: Serviço de Dermatologia – HOVET/USP): Alopecia e eritema focal em extremidade de cauda (“cauda em batom”).

O exame histopatológico foi fundamental para a consecução do cabal diagnóstico da dermatomiosite. A degeneração vacuolar ao nível da camada basal observada é a alteração epidérmica clássica, mas pode ser pouco evidente em parte dos casos (4).

No presente relato, a associação da pentoxifilina com prednisona melhorou, parcialmente, o quadro tegumentar. Esta resposta foi similar àquela referida na maioria dos

acompanhamentos já realizados, onde pouca melhora foi alcançada (9). Apenas no trabalho publicado por Rees et al. (9) refere-se à redução significativa das lesões tegumentares com a utilização de tal ativo. A gravidade de tal dermatopatia pode variar de moderada, sendo resolvida dentro de algumas semanas, a grave, com o quadro se prolongando por meses, anos ou mesmo durante toda a vida do animal (9).

Nesse paciente, a provável razão para ocorrência de melhora apenas parcial do quadro está relacionada tanto à etiopatogenia pouco conhecida quanto à cronicidade do quadro, que resultou, por fim, em lesões cutâneas cicatriciais permanentes.

REFERÊNCIAS

01. Wahl JM, Clark LA, Skalli O, Ambrus A, Rees CA, Mansell JL, et al. Analysis of gene transcript profiling and immunobiology in Shetland sheepdogs with dermatomyositis. *Vet Dermatol.* 2008;19:52-8.
02. Shelton GD. From dog to man: the broad spectrum of inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord.* 2007;17:663-70.
03. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. Interface diseases of the dermal-epidermal junction. In: *Skin diseases of the dog and the cat.* California: Blackwell Science; 2005. p.49-52.
04. Larsson CE, Nahas CR, Lucas R, Michalany NS. Dermatomiosite familiar canina – relato de casos. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; 1993, São Paulo.* São Paulo: Conpavepa; 1993. p.14.
05. Scoot DW, Miller WH, Griffin CG. Defeitos congênitos e hereditários. In: *Dermatologia de pequenos animais.* Rio de Janeiro: Interlivros; 1996. p.687-752.
06. Hargis AM, Haupt KH, Hegreberg GA, Prieur DJ, Moore MP. Familial canine dermatomyositis. Initial characterization of the cutaneous and muscular lesions. *Am J Pathol.* 1984;116:234-44.
07. Machado LHA, Cardoso MJL, Fabris VE, Antunes MIPP. Dermatomiosite canina familiar: relato de caso. *Clin Vet.* 2009;81:106-10.
08. Rondelli MCH, Marinho FA, Alves MAMK, Werner J, Cipólli VMM, Tinucci-Costa M. Dermatomiosite canina – relato de três casos. *Clin Vet.* 2011;93:58-62.
09. Rees CA, Boothe DM, Wilkie S. Therapeutic response to pentoxifylline and its active metabolites in dogs with dermatomyositis. In: *Abstracts from the American Academy of Veterinary Dermatology and American College of Veterinary Dermatology Annual Meeting.* New Orleans. New Orleans, LA: AAVD & ACVD; 2002. p.220.

Recebido em: 14/02/12

Aceito em: 13/07/12

GLIAL CELLS ANEUPLOID FROM CULTURE OF EQUINE NEONATE SPINAL CORD

Leandro Maia¹
Ligia Souza Lima de Oliveira da Mota²
Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga³
Renee Laufer-Amorim⁴
Bruna De Vita³
Carolina Nogueira de Moraes³
Rogério Martins Amorim¹

ABSTRACT

The aim of this communication is to report the occurrence of glia cells aneuploid obtained from the culture of spinal cord of a newborn horse. Cells were maintained in culture until the sixth passage characterized by immunocytochemistry technique prior to cytogenetic analysis. Karyotype analysis showed loss or gain of one or more chromosomes in glial cells analyzed, when compared with the normal karyotype for equine specie. The occurrence of aneuploidy may be considered a normal finding in young neural cells, as well as a signal of several diseases. Thus, others cytogenetic studies should be performed to elucidate if the high occurrence of aneuploid glial cells in equine neonate nervous system is a physiological or pathological finding.

Keywords: nervous system, cell culture, cytogenetic, kariotype, aneuploidy, horse.

ANEUPLOIDIA EM CÉLULAS DA GLIA PROVENIENTES DA CULTURA DE MEDULA ESPINHAL DE EQUINO NEONATO

RESUMO

O objetivo desta comunicação é relatar a ocorrência de aneuploidia em células da glia provenientes do cultivo da medula espinhal de um equino neonato. As células foram mantidas em cultivo até a sexta passagem e caracterizadas pela técnica de imunocitoquímica previamente à análise citogenética. A análise do cariótipo revelou perda ou ganho de um ou mais cromossomos nas células glias analisadas, quando comparado ao cariótipo normal para espécie equina. A ocorrência de aneuploidia pode ser considerada um achado normal em células jovens, bem como um sinal de enfermidade severa. Desta forma, outros estudos citogenéticos devem ser realizados para elucidar se a elevada ocorrência de aneuploidia observadas em células da glia no sistema nervoso de neonato equino é achado fisiológico ou patológico.

Palavras-chave: sistema nervoso, cultura celular, citogenética, cariótipo, aneuploidia, cavalo.

¹ Department of Veterinary Clinics. School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University UNESP, Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo, Brazil.

² Department of Genetics. São Paulo State University UNESP, Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo, Brazil.

³ Department of Animal Reproduction. School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University UNESP, Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Animal Pathology. School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University UNESP, Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo, Brazil.

ANEUPLOIDÍA EN CÉLULAS DE LA GLÍA PROVENIENTES DEL CULTIVO DE LA MÉDULA ESPINAL DE EQUINO NEONATO

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es reportar la presencia de aneuploidía en células de la glía provenientes del cultivo de médula espinal de un neonato equino. Las células fueron mantenidas en cultivo hasta el sexto pasaje y caracterizadas por la técnica de inmunocitoquímica previamente a la realización de la citogenética. El análisis del cariotipo reveló pérdida o ganancia de uno o más cromosomas en las células gliales analizadas, en comparación con el cariotipo normal. La presencia de aneuploidía puede ser considerada un hallazgo normal en células jóvenes, bien como una señal de enfermedad severa. De esta forma, otros estudios citogenéticos deben ser realizados para esclarecer si la presencia elevada de aneuploidía en células de la glía del sistema nervioso de neonatos equinos constituye un hallazgo fisiológico o patológico.

Palabras clave: sistema nervioso, cultivo celular, citogenética, cariotipo, aneuploidía, caballo

Cytogenetics is a hybrid science that employs elements and methodology of genetics and cytology as well as from the analysis of the structure, morphology and behavior of chromosomes. The use of this technique allows to obtain information that helps to clarify issues related to reproduction, biology and evolution (1). The intercellular genomic variations that have probably the most appreciable impact on brain development and neurogenesis are related to aneuploidy or gain/loss of whole chromosomes. Affecting large proportions of neural cells, aneuploidy is usually devastating and it is suggested to be the hallmark of numerous pathogenic processes in human brain (2). However, according to Kingsbury *et al.* (3) the existence of aneuploid cells within the mammalian brain has suggested the influence of genetic mosaicism on normal neural circuitry. The objective of this scientific communication is to report the occurrence of glial cells aneuploid obtained from the spinal cord of a newborn horse and subjected to *in vitro* culture.

Samples from the spinal cord were obtained, during necropsy from the cervical region of a newborn female horse with 6 days of age. The samples were aseptically collected just after the animal death and placed in Falcon tubes (Techno Plastic Product® AG, Switzerland) with phosphate buffer solution (PBS - Nutricell®, Brazil) at a pH of 7.2.

At the laboratory the samples were fragmented with the help of a scalp blade (Two Arrows, China) and subjected to enzymatic digestion with 0.4% Type 1 collagenase (Gibco, Grand Island, NY, USA) during one hour at 37°C. Every 10 minutes the material was spin in a Vortex (Biomixer, USA). At the end of digestion period the cells were centrifuged for 10 minutes at 400 x g, and washed twice in Low Glucose DMEM (Dulbecco's modified medium, Gibco, Grand Island, NY, USA).

The cell suspension was divided into two 25 cm² culture bottles and the volume was completed to 5 mL of medium. The cells were cultured in Low Glucose DMEM/F12 (1:1) supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin/streptomycin (1%) and anphotericin (1.2%). The material was incubated at 37.5°C in a 5% CO₂ in air atmosphere with 95% humidity. Cellular growth was monitorised every 24 hours in a inverted microscope (Leica Microsystems, Germany) and the subcultures were performed when the cells achieved at least 80% confluence.

Cell culture was maintained until the 6th passage and during this period samples were collected for imunocytochemistry characterization using markers for *glial fibrillary acidic*

protein (GFAP) (Dako Cytomation, Denmark), S100Protein (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) and vimentin (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark).

After the confirmation of the neural line, GFAP, vimentin and S100 protein positive, the glial cells from the 3rd and the 6th passage were subjected to the cytogenetic analysis using the technique of cell cycle synchronization with methotrexate (MTX) and thymidine. For the slides preparation cells were suspended with trypsin at 37.0°C, fixed in 5% Giemsa and analyzed in a light microscope. For each passage 12 metaphases were analyzed.

The results showed aneuploid glial cells formed by the gain or loss of one or more chromosomes (Table 1) when compared with the species normal karyotype (2n= 64) (4).

Aneuploidy was also reported in studies performed in samples from the human (5-7) and mouse (3, 8) brain, supporting the data founded in the present study. The occurrence of aneuploidy may be considered normal in young neural cells, as well as a signal of several diseases. Consequently, others cytogenetic studies should be performed to elucidate if the high occurrence of aneuploid glial cells in equine neonate nervous system is a physiological or pathological finding.

The results of the present report may contribute to the study of genetic diseases and the clarification of the physiological mechanisms of the nervous system development, since it was previously shown the aneuploid neural cells can be functional (3).

Table 1. Diploid number of chromosomes founded in 12 metaphase obtained from a newborn horse glial cells cultured *in vitro* during the 3rd, 4th, 5th, and 6th passage.

| Metaphase | Number of chromosomes 3 rd passage (2n =) | Number of chromosomes 4 th passage (2n =) | Number of chromosomes 5 th passage (2n =) | Number of chromosomes 6 th passage (2n =) |
|-----------------------------|--|--|--|--|
| 1 | 57 | 64 | 60 | 56 |
| 2 | 59 | 58 | 64 | 64 |
| 3 | 64 | 63 | 59 | 62 |
| 4 | 56 | 62 | 64 | 62 |
| 5 | 60 | 64 | 64 | 61 |
| 6 | 59 | 60 | 62 | 64 |
| 7 | 62 | 64 | 62 | 59 |
| 8 | 64 | 64 | 64 | 56 |
| 9 | 62 | 59 | 65 | 62 |
| 10 | 60 | 64 | 66 | 56 |
| 11 | 61 | 64 | 64 | 58 |
| 12 | 55 | 63 | 64 | 64 |
| Aneuploid proportion | 83,3% | 50 % | 50% | 75% |

Normal karyotype for the equine species: 2n= 64 (Richer and others 1990).

ACKNOWLEDGEMENTS:

CNPq, FUNDUNESP and FAPESP (Financial Support).

REFERENCES

1. Maia L, Amorim RM, Mota LSLS, Alvarenga FCL, Amorim RL, De Vita B, et al. Cytogenetic evaluation of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. In:

- Proceedings of 5th Annual International Meeting of the Portuguese Society for Stem Cells and Cellular Therapies; 2010, Guimaraes. Caldas das Taipas: SPCE-TC; 2010. p.41.
2. Iurov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. Detection of aneuploidy in neural stem cells of the developing and adult human brain. *Electron J Biol.* 2008;4:36-42.
 3. Kingsbury MA, Friedman B, McConnell MJ, Rehen SK, Yang AH, Kaushal D, et al. Aneuploid neurons are functionally active and integrated into brain circuitry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:6143-7.
 4. Richer CL, Power MM, Klunder LR, McFeely RA, Kente GM. Standard karyotype of the domestic horse (*Equus caballus*). Committee for standardized karyotype of *Equus caballus*. In: *The Second International Conference for Standardization of Domestic Animal Karyotypes*; 1990, Jouy-en Josas. França: INRA; 1990. p.289-93.
 5. Yurov YB, Iurov IY, Monakhov VV, Soloviev LV, Vostrikov VM, Vorsanova SG. The variation of aneuploidy frequency in the developing and adult human brain revealed by an interphase FISH study. *J Histochem Cytochem.* 2005;53:385-90.
 6. Yurov YB, Iurov IY, Vorsanova SG, Liehr T, Kolotii AD, Kutsev SI, et al. Aneuploidy and confined chromosomal mosaicism in the developing human brain. *PLoS One.* 2007;2:1-6.
 7. Iourov IY, Vorsanova SG, Liehr T, Yurov YB. Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia brain: differential expression and pathological meaning. *Neurobiol Dis.* 2009;34:212-20.
 8. Rehen SK, McConnel MJ, Kaushal D, Kingsbury MA, Yang AH, Chun J. Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:3331-6.

Recebido em: 10/02/12

Aceito em: 02/04/12

RISCO DE TRANSMISSÃO DA RAIVA HUMANA PELO CONTATO COM SAGUIS (*Callithrix jacchus*) NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL

Tereza D'ávila de Freitas Aguiar¹
Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior¹
Edmara Chaves Costa¹
Benedito Neilson Rolim¹
Phyllis Catharina Romijn²
Nélio Batista de Moraes³
Maria Fátima da Silva Teixeira⁴

RESUMO

Uma nova variante do vírus da raiva foi identificada em associação a casos de raiva em humanos, no estado do Ceará, transmitidos por saguis (*Callithrix jacchus*), primatas frequentemente criados como animais de estimação. O objetivo do estudo foi fazer um levantamento dos fatores de risco de transmissão da raiva para humanos pelo contato com saguis (*C. jacchus*) domiciliados e semidomiciliados na região metropolitana de Fortaleza, Ceará. Foi aplicado um questionário aos criadores de saguis (*C. jacchus*), residentes nos municípios de Aquiraz e Maranguape, Ceará, enfocando o manejo da criação desses animais, dando ênfase à probabilidade de seu contato próximo com o homem. Foram identificadas 19 residências onde mantinham saguis (*C. jacchus*) como animais de estimação. A análise dos questionários mostrou a proximidade dos criadores com os saguis, durante o manejo desses primatas nos domicílios. Os saguis (*C. jacchus*) representam risco, quanto à transmissão da raiva, às pessoas que mantêm esses pequenos primatas em ambiente doméstico.

Palavras-chave: sagui, *Callithrix jacchus*, humanos, risco, raiva.

RISK OF RABIES TRANSMISSION BY HUMAN CONTACT WITH MARMOSETS (*Callithrix jacchus*) IN CEARÁ STATE, BRAZIL

ABSTRACT

A new variant of the rabies virus was identified, associated with cases of human rabies, in the state of Ceará, transmitted by common marmosets (*Callithrix jacchus*), which are frequently kept as pets. The present study aimed at evaluating the risk factors of transmitting human rabies by contact with domiciliary captive common marmosets (*C. jacchus*) in the metropolitan region of Fortaleza, Ceará. A questionnaire that focused on animal management and interaction between humans and primates was applied to people who kept marmosets in the municipalities of Aquiraz and Maranguape. 19 residences were identified where they had common marmosets (*C. jacchus*) as pets. After questionnaire analysis, it was found that there is a close relationship between humans and their pet marmosets, especially during management practices. The common marmosets (*C. jacchus*) represent risk, for the

¹ Aluno do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza - Ceará.

² Pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro, PESAGRO – RIO, Rio de Janeiro, RJ.

³ Aluno da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza - Ceará.

⁴ Professora Doutora do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza - Ceará.

Apoio financeiro: CAPES – Bolsa de Mestrado; FUNCAP.

Local de execução: Universidade Estadual do Ceará. Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, 60742.000, Fortaleza, CE.
Tel: 85 31019849; Fax: 85 31019849.

e-mail: labovirfavetuece@yahoo.com (endereço para correspondência)

transmission of rabies, to people who keep these small primates in the home environment.

Keywords: common marmoset, *Callithrix jacchus*, contact, humans, rabies.

RIESGO DE TRANSMISION DE RABIA HUMANA POR EL CONTACTO CON SAGUIS (*Callithrix jacchus*) EN EL ESTADO DE CEARÁ, BRASIL.

RESUMEN

Una nueva variedad de virus de rabia fue identificado y asociado a casos de rabia en humanos en el estado de Ceará, transmitidos por sagüis (*Callithrix jacchus*), primate frecuentemente criado como animal de estimación. El objetivo de este estudio fue hacer un levantamiento de los factores de riesgo de transmisión de Rabia humana por el contacto con sagüis (*C. jacchus*) en cautiverio y semicautiverio en la región metropolitana de Fortaleza, Ceará. Fue realizada una encuesta a los criadores de sagüis (*C. jacchus*), residentes de los municipios de Aquiraz y Maranguape, Ceará, enfocada al manejo y crianza de estos animales, dando énfasis a la probabilidad de su contacto próximo con el hombre. Fueron identificadas 19 residencias donde mantenían sagüis (*C. jacchus*) como animales de estimación. El análisis de las encuestas mostró la proximidad de los criadores con los sagüis durante el manejo de estos primates en los domicilios. Los sagüis (*C. jacchus*) representan un riesgo en cuanto a la transmisión de rabia para las personas que mantienen estos pequeños primates en ambiente domestico.

Palabras claves: sagüi, *Callithrix jacchus*, humanos, riesgo, rabia.

A Raiva é uma doença infecto-contagiosa, que acomete todos os animais de sangue quente. É causada por vírus neurotrópicos que atuam no sistema nervoso central (SNC), provocando uma encefalomielite aguda e fatal, resultante principalmente da transmissão do vírus pela mordedura do animal infectado (1).

No Estado do Ceará, os animais silvestres apresentam uma importância emergente quanto à Raiva, sendo as espécies *Procyon cancrivorus* (guaxinim) e *Callithrix jacchus* (sagüi do tufo branco) importantes transmissores da Raiva para seres humanos (2). Nesse estado, é comum a identificação do *C. jacchus* em ambiente doméstico, tendo sido registrados casos de agressões com notificações de casos de Raiva humana. Em associação a estes casos, foi identificada uma variante do vírus da Raiva, sem proximidade antigênica ou qualquer relação genética conhecida com as variantes do vírus da Raiva encontradas em morcegos ou mamíferos terrestres das Américas (3). Dessa forma, o objetivo do trabalho foi fazer um levantamento dos fatores de risco de transmissão da Raiva humana pelo contato com saguis (*C. jacchus*) domiciliados e semidomiciliados na região metropolitana de Fortaleza, Ceará.

Foi aplicado um questionário estruturado, destinado à criadores de saguis (*C. jacchus*), enfocando o manejo de criação desses animais, dando maior ênfase à probabilidade de sua aproximação com o homem. O contato com os estabelecimentos se deu por meio de visitas. As áreas incluídas na pesquisa foram os municípios de Aquiraz e Maranguape da região metropolitana de Fortaleza, Estado do Ceará.

Por ocasião da entrevista foi apresentado aos participantes um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, cujo teor abrangeu esclarecimentos a cerca da natureza da pesquisa, voluntariedade da participação e garantia do sigilo concernente às informações coletadas. Essa pesquisa passou pela apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Ceará (CEP/UECE), sendo aprovada sob o número do processo 09230145-2 no ano de 2009.

Os resultados definitivos dos questionários foram compilados em um banco de dados do programa EXCEL, organizados e apresentados na forma de gráficos e tabelas, sendo agrupados para a realização de análise descritiva dos elementos sob investigação.

Foram identificadas 19 residências onde o sagui (*C. jacchus*) era criado como animal de estimação, distribuídas quase que homogeneamente entre os municípios de Aquiraz (47%) e Maranguape (53%) na Região Metropolitana de Fortaleza no Estado do Ceará. A escolha da região metropolitana se deu por ser a área de maior concentração populacional do estado, sendo selecionados municípios com registro de casos de Raiva silvestre (4).

Mais da metade das habitações, 11/19 (57,89%), mantinha os saguis (*C. jacchus*) somente em domicílio, enquanto que 36,84% (7/19) mantinha em semidomicílio. Dentre as residências, 1/19 (5,26%) mantinha saguis tanto de forma domiciliada quanto semidomiciliada (Figura 01). A condição dos saguis semidomiciliados viverem em “vida livre” e se aproximarem de saguis domiciliados aumenta a probabilidade da transmissão de doenças, em destaque a Raiva.



Figura 01. Saguis (*Callithrix jacchus*) sendo criados tanto em domicílio (dentro da gaiola) quanto em semidomicílio (fora da gaiola), em uma das residências do estudo. Ceará, Brasil, 2009. Fonte: Tereza D’ávila de Freitas Aguiar.

Mais da metade dos saguis criados como animais de estimação foram adquiridos ainda filhotes (57,9%) e uma minoria já no estágio adulto (5,3%). Os saguis semidomiciliados, 36,8%, foram classificados em “filhote, jovem e adulto” por serem animais que vivem em grupos familiares. Os dados encontrados são análogos aos de Rodrigues (5), em um estudo realizado em Brejo Grande do Araguaia, onde 65,7% dos animais silvestres criados em cativeiro foram adquiridos ainda filhotes ou jovens. Segundo Wissman (6), os saguis tem um forte potencial para a domesticação. Quando filhotes acostumam-se bem com humanos, mas

podem morder por medo, defesa ou brincadeira e, ao chegar à maturidade sexual, tornam-se territorialistas, agressivos e poderão morder pessoas estranhas e até seus proprietários.

Todos os criadores afirmaram realizar alguma limpeza no ambiente em que mantinha o sagui, a maioria deles (58%) realizava a limpeza diariamente. Dentre as diversas formas de depósito do alimento fornecido ao saguis pelos criadores, as que mais chamaram atenção foram as que mostraram o contato direto dos humanos com esses animais, como exemplos, os criadores que colocavam o alimento acondicionado em recipiente dentro da gaiola, perfazendo um percentual de 31,58 dos criadores, e um criador (5,26%) que colocava o alimento em recipiente tanto dentro quanto fora da gaiola (Tabela 01).

Tabela 01. Distribuição de criadores quanto a forma de depositar o alimento oferecido aos saguis (*Callithrix jacchus*). Ceará, Brasil, 2009.

| Forma de depositar o alimento | Frequência | |
|--|------------|---------------|
| | Absoluta | Relativa (%) |
| Coloca acondicionado em recipiente dentro da gaiola com a presença do animal | 6 | 31,58 |
| Coloca acondicionado em recipiente fora e dentro das gaiolas, na presença do animal | 1 | 5,26 |
| Coloca solto no peridomicílio, sem recipiente | 8 | 42,11 |
| Coloca acondicionado em recipiente solto no interior da residência sem o contato direto com o animal | 4 | 21,05 |
| Total | 19 | 100,00 |

A maioria dos criadores (68%) afirmou não ter o hábito de passear com o sagui, mas 32% apresentou esse hábito. A ocorrência do costume de passear com esses animais é de grande relevância, pois representa um importante fator de risco, devido a maior exposição do sagui, que é transmissor de diversas doenças comuns ao homem, inclusive a raiva, à vizinhança do domicílio. Quanto às formas de como os criadores costumavam passear com o sagui, 50% deles afirmou passear com o animal solto e 50% com o animal mantido em gaiola.

A ocorrência do contato entre humanos e saguis é um fator de risco de grande relevância no tocante à raiva. Dentre os criadores entrevistados, a grande maioria (84,21%) afirmou que já teve contato com os animais. Esse fato indica quão próximos são os saguis de seus criadores (Figura 2) e a partir dessa interação aumenta a probabilidade da ocorrência de agressões e da transmissão de doenças como a raiva.

O uso de vacinas orais, por meio de iscas, lançadas por aviões nas matas, têm sido utilizadas nos Estados Unidos e na Europa para imunização de mamíferos silvestres que vivem em vida livre. Nos Estados Unidos, essa estratégia não tem funcionado bem, mas em alguns países europeus tem produzido resultados satisfatórios. No Brasil, como as matas são fechadas, é provável que as iscas fiquem presas às copas das árvores e, assim, os mamíferos não tenham acesso às vacinas orais. A melhor solução para controlar a raiva silvestre no país ainda é investir em educação e no monitoramento dos animais envolvidos nesse ciclo da doença (7).

Diante os resultados obtidos, pode-se concluir que os saguis (*C. jacchus*) representam risco, quanto a transmissão da raiva, às pessoas que mantêm esses pequenos primatas em ambiente doméstico. Ademais, cabe evidenciar que a forma de manejo dos saguis nos

domicílios pode ocasionar uma maior exposição dos criadores a eventos como agressões, aumentando o potencial risco de transmissão de zoonoses, incluindo a raiva.



Figura 02. Contato direto de uma criança com o sagui (*Callithrix jacchus*), mantido em gaiola, em um dos domicílios visitados no município de Maranguape, CE. Ceará, Brasil, 2009. Fonte: Tereza D'ávila de Freitas Aguiar

REFERÊNCIAS

1. Tordo N, Charlton K, Wandeler AI. Rhabdoviruses: rabies. In: Collier LH, editor. Microbiology and microbial infections. London: Arnold Press; 1998. p.665-92.
2. Araujo DB, Medina AO, Cunha EMS, Favoretto SR, Durigon EL. Estudo Epidemiológico do vírus da Raiva em mamíferos silvestres provenientes de área de soltura no litoral norte do estado de São Paulo, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 2008; Gramado. Gramado: Conbravet; 2008. p.35.
3. Favoretto SR, Mattos CC, Morais NB, Araújo FAA, Mattos CA. Rabies in marmosets, Ceara, Brazil - *Callithrix jacchus* - Dispatches. Emerg Infect Dis. 2001;7:1062-5.
4. Romijn PC. Análise da epidemiologia e desenvolvimento educacional para o controle da Raiva Silvestre no Estado do Ceará. Fortaleza/CE: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos; 2008.

5. Rodrigues PHM. Levantamento da fauna silvestre mantida em cativeiro na cidade de Brejo Grande do Araguaia, Pará: perfil dos criadores e caracterização das formas de criação [Internet]. Brejo Grande do Araguaia. Brejo Grande do Araguaia – PA; 2006 [acesso em 2010 Maio 11]. Disponível em: http://marte.museu-goeldi.br/marcioayres/paginas/download/1_ens_medio_2006.pdf
6. Wissman MA. Nutrition and husbandry of callitrichids (marmosets and tamarins). *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 1999;2:209-40.
7. Morais NB, Romijn PC. Doenças emergentes [Internet]. Agência Fundação Oswaldo Cruz de Notícias, Saúde e Ciência para todos. [S.l.] 2004 [acesso em 2010 Maio 11]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1003&sid=12>

Recebido em: 02/09/10

Aceito em: 22/05/12

LOBAÇÃO PULMONAR E DISTRIBUIÇÃO BRÔNQUICA DA JARITATACA (*Conepatus semistriatus*, Boddaert, 1785) - COMUNICAÇÃO CURTA

Matheus Camargos de Britto Rosa¹
Gabriela Castro Lopes¹
Carlos Eduardo Oliveira Sestari²
Gregório Corrêa Guimarães¹
Fabrício Singaretti Oliveira²

RESUMO

Este estudo objetivou descrever a lobação pulmonar e a distribuição brônquica da jaritataka. Foram utilizados quatro espécimes provenientes de atropelamentos. Os animais exibiram pulmões em forma de semicone e os lobos cranial, médio, caudal e acessório formaram o pulmão direito. O pulmão esquerdo exibiu lobos cranial e caudal, sem divisão do lobo cranial. O brônquio principal direito se trifurcou em um brônquio para o lobo cranial, um para o médio e um para os lobos caudal e acessório. O brônquio lobar cranial direito se dividiu em três brônquios segmentares; o brônquio lobar acessório e o lobar médio direito originaram dois brônquios segmentares; o brônquio lobar caudal direito deu origem a seis brônquios segmentares. O brônquio principal esquerdo bifurcou-se em um brônquio para o lobo cranial e um para o lobo caudal. O brônquio lobar cranial esquerdo dividiu-se em seis brônquios segmentares, assim como o brônquio lobar caudal esquerdo. A distribuição brônquica e a lobação dos pulmões da jaritataka são diferentes das reportadas em carnívoros domésticos e roedores selvagens.

Palavras-chave: pulmão, lobação, brônquio, *Conepatus semistriatus*

LUNG LOBATION AND BRONCHIAL DISTRIBUTION IN THE STRIPED HOG- NOSED SKUNK (*Conepatus semistriatus*, Boddaert, 1785) – SHORT COMMUNICATION

ABSTRACT

This study aimed to anatomically describe the lung lobation and bronchial distribution in the striped hog-nosed skunk. Lungs of four animals which were run over were used. Animals presented semicone-shaped lungs and the right lung was constituted by cranial, middle, caudal and accessory lobes. The left lung presented cranial and caudal lobes, and no cranial lobe division was noted. The right main bronchus divided into one bronchus to the cranial lobe, one to the middle lobe and one to the caudal and accessory lobes. The right cranial lobar bronchus divided into three segmental bronchi; the accessory lobar bronchus and the right middle lobar bronchus gave origin to two segmental bronchi; the right caudal lobar bronchus originated six segmental bronchi. The left main bronchus bifurcated into a bronchus to the cranial and a bronchus to the left caudal lobes. The left cranial lobar bronchus divided into six segmental bronchus, as well as the left caudal bronchus. The bronchial distribution and the lung lobation in the striped hog-nosed skunk are different from the ones reported in domestic carnivorous and wild rodents.

Keywords: lung, lobation, bronchus, *Conepatus semistriatus*

¹ Depto de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Lavras (UFLA)

² Depto de Medicina Veterinária - Universidade Estadual de Maringá (UEM)

DISTRIBUCIÓN DE LÓBULOS PULMONARES Y ÁRBOL BRONQUIAL DE LA MOFETA BILISTADA (*Conepatus semistriatus*, Boddaert, 1785) – COMUNICACIÓN CORTA

RESUMEN

Este estudio tuvo por objetivo describir la distribución de los lóbulos pulmonares y el árbol bronquial de la mofeta bilistada. Fueron empleados cuatro especímenes provenientes de atropellamientos. Los animales exhibieron pulmones en forma casi cónica y el pulmón derecho estaba formado por lóbulos craneal, medio, caudal y accesorio. El pulmón izquierdo exhibió lóbulos craneal y caudal, pero sin división del lóbulo craneal. El bronquio principal derecho se trifurcó en un bronquio para el lóbulo craneal, uno para el medio, y uno para los lóbulos caudal y accesorio. El bronquio lobular craneal derecho se dividió en tres bronquios segmentares; el bronquio lobular accesorio y el lobular medio derecho originaron dos bronquios segmentares; ya el bronquio lobular caudal derecho dio origen a seis bronquios segmentares. El bronquio principal izquierdo se bifurcó en un bronquio para el lóbulo craneal y uno para el lóbulo caudal. El bronquio lobular craneal izquierdo se dividió en seis bronquios segmentares, así como el bronquio lobular caudal izquierdo. La distribución de bronquios y de lóbulos pulmonares de la mofeta es diferente de la reportada en la literatura para carnívoros domésticos y roedores salvajes.

Palabras-clave: pulmón, lóbulo, bronquio, *Conepatus semistriatus*

A jaritataca é um carnívoro da família *Mephitidae*, possuindo distribuição no sul do México, norte do Peru e dos Andes, e populações isoladas no Brasil (1). No Brasil, tem sido observada na Mata Atlântica no município de Viçosa, MG (2), no Parque Nacional das Emas, GO (3) e em regiões da Bahia (4), evitando habitar regiões de florestas densas (5).

O objetivo deste trabalho é descrever a lobação pulmonar e a distribuição brônquica da jaritataca, fornecendo base para futuros estudos clínicos, além de contribuir com a anatomia comparada de carnívoros.

Foram utilizados os pulmões de quatro exemplares de jaritataca (Figura 1), adultos, 3 machos e 1 fêmea, mortos em rodovias do estado de Minas Gerais, os quais foram resgatados por pesquisadores do projeto “Corredores naturais - entendendo os efeitos de estradas nos processos de fragmentação e conectividade - CRA-APQ-02805-09/FAPEMIG” e transportados para o Laboratório de Anatomia Animal da Universidade Federal de Lavras, MG. A coleta dos cadáveres foi realizada com autorização do ICMBIO N° 31887-1 código de autenticação 94134329.

Os animais foram fixados por injeções intra-musculares e intra-viscerais com solução de formaldeído a 10%. As peças foram mantidas na mesma solução por pelo menos 72 horas, e então, lavadas em água corrente para posterior dissecação e fotodocumentação.

Não houve diferenças entre as peças anatômicas utilizadas. O pulmão direito da jaritataca apresentou os lobos cranial, médio, caudal e acessório. O pulmão esquerdo exibiu dois lobos, cranial e caudal, os quais não possuem subdivisão. Ambos exibiram fissuras interlobares profundas, deixando os lobos praticamente independentes um do outro (Figura 2).



Figura 1. Vista dorsal de exemplar macho de jaritataka (*Conepatus semistriatus*) fixado em solução de formaldeído a 10%.

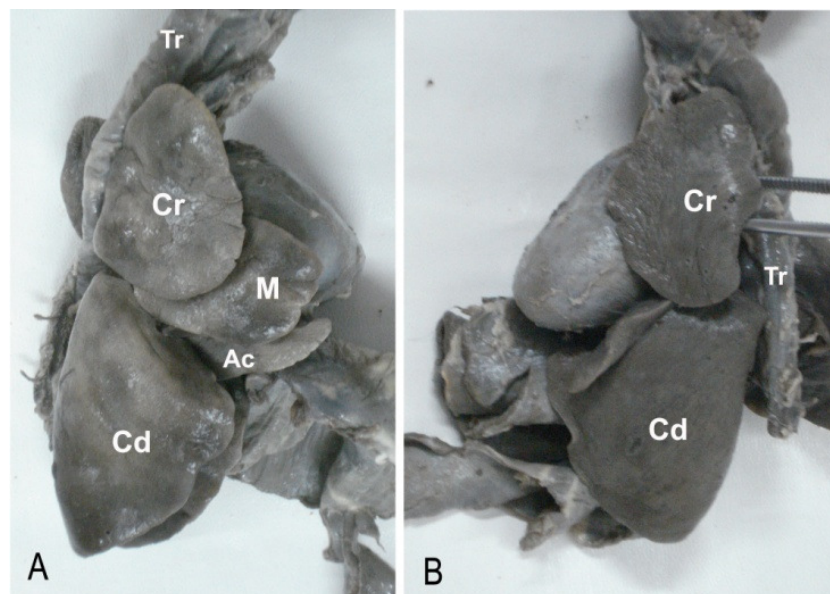


Figura 2. Vista costal dos pulmões direito (A) e esquerdo (B) da jaritataka. Traqueia (Tr) e lobos cranial (Cr), caudal (Cd), médio (M) e acessório (Ac) são visíveis na figura.

O brônquio principal direito se trifurcou em um brônquio para o lobo cranial, um para o médio e um para os lobos caudal e acessório. O brônquio lobar cranial direito se dividiu em três brônquios segmentares (cranial, mediodorsal e caudal); o brônquio lobar acessório e o lobar médio direito originaram dois brônquios segmentares (ventral e dorsal); o brônquio lobar caudal direito deu origem a seis brônquios segmentares (cranioventral, craniodorsal, mediodorsal, medioventral, caudodorsal e caudoventral).

O brônquio principal esquerdo bifurcou-se em um brônquio para o lobo cranial e um para o lobo caudal. O brônquio lobar cranial esquerdo dividiu-se em seis brônquios segmentares (cranioventral, craniodorsal, mediocranial, mediocaudal, caudoventral e caudodorsal), assim como o brônquio lobar caudal esquerdo (cranioventral, craniodorsal, medioventral, mediodorsal, caudoventral e caudodorsal (Figura 3).

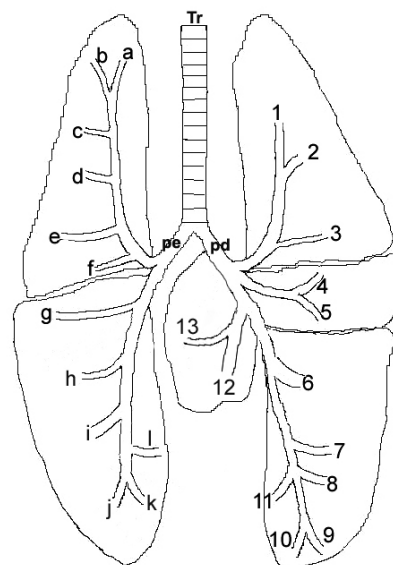


Figura 3. Representação da lobação e distribuição brônquica dos pulmões da jaritataca (*Conepatus semistriatus*), vista dorsal. Tr: traqueia. pd: brônquio principal direito. pe: brônquio principal esquerdo. Pulmão direito: brônquios segmentares cranial (1), mediodorsal (2) e caudodorsal (3) para o lobo cranial; ventral (4) e dorsal (5) para o lobo médio; cranioventral (6), craniodorsal (7), mediodorsal (8), medioventral (11), caudodorsal (9) e caudoventral (10) para o lobo caudal; ventral (13) e dorsal (12) para o lobo acessório. Pulmão esquerdo: brônquios segmentares cranioventral (a), craniodorsal (b), mediocranial (c), mediocaudal (d), caudodorsal (e) e caudoventral (f) para o lobo cranial; cranioventral (g), craniodorsal (h), mediodorsal (i), medioventral (l), caudodorsal (j) e caudoventral (k) para o lobo caudal.

No pulmão da jaritataca, havia fissuras interlobares evidentes entre os lobos, similarmente aos canídeos (6, 7), felídeos domésticos (8), mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) (9) e aos roedores selvagens, como as cutias (*Dasyprocta azarae*) (10).

Não houve divisão do lobo cranial esquerdo, similarmente ao descrito para o mão-pelada (9) e para os equinos (6), diferentemente do descrito para os carnívoros domésticos (6), cutias (10), capivaras (*Hydrochaerus hydrochaeris*) (11) e pacas (*Agouti paca*) (12).

Nos lobo médio direito e acessório, observou-se um brônquio lobar que se bifurcava em brônquios segmentares, como ocorre nos carnívoros domésticos (6) e no mão-pelada (9).

Os seis brônquios segmentares existentes no lobo caudal direito da jaritataca diferiram da distribuição observada na cutia (10) e na paca (12), as quais exibiram apenas um grande brônquio para este lobo. No lobo cranial esquerdo da jaritataca também se observaram seis brônquios segmentares, o que é diferente do descrito em cutias (10), pacas (12) e mão-pelada (9), os quais possuem duas, duas e três divisões bronquiais neste lobo, respectivamente.

No lobo caudal esquerdo, os seis brônquios segmentares existentes na jaritataca diferiram do observado em cutias (10) e pacas (12) que exibiram, respectivamente, um ou três brônquios segmentares.

A distribuição brônquica e a lobação dos pulmões da jaritataca são diferentes das reportadas em carnívoros domésticos e roedores selvagens, sendo marcante a não divisão do lobo cranial esquerdo, como observado no mão-pelada e no equino.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e ao Professor Alex Bager, do Departamento de Biologia da UFLA, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Nowak RM. Walker's carnivores of the world. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2005.
2. Prado MR, Rocha EC, Del Giudice GML. Mamíferos de médio e grande porte em um fragmento de mata atlântica, Minas Gerais, Brasil. Rev Arvore. 2008;32:741-9.
3. Rodrigues FHG, Silveira L, Jacomo ATA, Carmignotto AP, Bezerra AMR, Coelho DC, et al. Composição e caracterização da fauna de mamíferos do Parque Nacional das Emas, Goiás, Brasil. Rev Bras Zool. 2002;19:589-600.
4. Bocchiglieri A, Mendonça AF, Henriques RPB. Composição e diversidade de mamíferos de médio e grande porte no Cerrado do Brasil central. Biota Neotrop. 2010; 10:169-76. [acesso em 2012 Jan 08]. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v10n3/pt/abstract?article+bn03110032010>.
5. Emmons LH, Feer F. Neotropical rainforest mammals: a field guide. Chicago: University of Chicago Press; 1997.
6. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. Aparelho respiratório. In: Tratado de anatomia veterinária. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.146-63.
7. Hare WCD. Sistema respiratório do carnívoro. In: Sisson S, Grossman ID. Anatomia dos animais domésticos. 5ª ed. Rio de Janeiro: Interamericana; 1986. p.1465-80.
8. Light GS. Atlas of feline anatomy for veterinarians. Philadelphia: W.B. Saunders; 1993. p.135-43.
9. Sestari CEO, Corrêa AF, Martins LL, Guimarães GC, Oliveira FS. Lobação pulmonar e distribuição brônquica em mão-pelada (*Procyon cancrivorus*, Cuvier, 1798) - relato de dois casos. Vet Zootec. 2011;18:374-8.
10. Penno AK, Carvalho MAM, Assis Neto AC, Azevedo LM, Mello GWS. Lobação, ramificação brônquica e distribuição arterial no pulmão da cutia (*Dasyprocta* sp., Mammalia Rodentia). Braz J Vet Res Anim Sci. 2005;42:327-32.
11. Citrângulo M, Ribeiro AACM, Moraes PTB, Machado MRF. Lobation and arterial vascularization of the lung of capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). Arq Cienc Vet Zool UNIPAR. 2001;4:119-27.
12. Rehder AMA, Cortellini LM, Oliveira FS, Machado MRF. Lobação, árvore brônquica e vascularização arterial do pulmão da paca (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766). Cienc Anim Bras. 2008;9:442-8.

Recebido em: 06/02/12**Aceito em: 01/08/12**

CONCENTRAÇÃO PROTEICA NOS FLUIDOS FETAIS COMO MÉTODO INDICADOR DA MATURIDADE RENAL DE FETOS CANINOS

Christiane da Silva Barreto¹
Nereu Carlos Prestes²
Fabiana Ferreira de Souza³
Roberta Valeriano dos Santos⁴
Priscilla Mitie Matayoshi⁴
Bruna De Vita⁵
Luciana da Silva Leal⁶

RESUMO

O rim fetal, embora imaturo durante seu período de formação contribui para a sobrevivência do concepto durante seu crescimento. A produção de urina depende de uma série de mecanismos renais, os quais são influenciados diretamente pelo volume e composição dos fluidos corpóreos do feto e pela disponibilidade de água e eletrólitos maternos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a maturidade renal pela identificação de proteínas de baixa massa molecular e alfa-fetoproteína por eletroforese em SDS-PAGE (12%). Foram obtidas 40 amostras de líquido amniótico e alantoideano de 16 cadelas gestantes pela cesariana. A densidade óptica integrada (IOD) da banda protéica de 66kDa, considerada como alfa-fetoproteínas, foi de 15,94 para o líquido amniótico e 13,3 para o alantoideano. Cinco bandas proteicas presentes em ambos os fluidos podem expressar a maturidade renal (32; 30; 28; 20 e 12). Baseado nas informações e nos dados estatísticos obtidos com o experimento pode-se afirmar que a concentração proteica nos fluidos amniótico e alantoideano é um indicador viável para avaliação da maturidade renal em fetos caninos ($p < 0,05$).

Palavras-chave: maturidade renal, fluidos fetais, proteínas, canino.

PROTEIN CONCENTRATION OF FETAL FLUIDS AS AN INDICATOR METHOD OF CANINE RENAL MATURITY

ABSTRACT

The fetal kidney, although immature during their development period, contributes to the fetal survival during maturation. The production of urine depends on several renal mechanisms, which are directly influenced by the volume and composition of the fetal body fluids and the availability of maternal water and electrolytes. The aim of this study was to evaluate renal maturity by identification of low molecular weight proteins and alpha-fetoprotein by electrophoresis in SDS-PAGE (12%). It was obtained 40 samples of amniotic and allantoic fluid of 16 pregnant bitches by cesarean section. The integrated optical density (IOD) of protein band with 66kDa, considered as alpha-fetoprotein, was 15.94 for the amniotic fluid

¹ Professora Assistente Doutora da Faculdade de Medicina (FEMA). Caxias - Maranhão.

² Professor Adjunto da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, nereu@fmvz.unesp.br. Suporte financeiro: FAPESP.

³ Professora de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Universidade de Franca

⁴ Mestrandas do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP – Botucatu

⁵ Doutoranda do Departamento Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP – Botucatu

⁶ Professora da Área de Reprodução Animal da UNIPAR – Campus de Umuarama –PR
Protocolo Comissão de Ética FMVZ/UNESP - Botucatu: 30/2002.

and 13.3 for the allantoids fluid . Five protein bands present in the both fluids can express the renal maturity (32, 30, 28, 20 and 12). With the information and statistical data obtained in this experiment, it can be conclude that the protein concentration in amniotic and allantoids fluids is a viable indicator for evaluation of the canine renal maturity ($p < 0.05$).

Keywords: renal maturity, fetal fluids, proteins, canine.

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS FLUIDOS FETALES COMO MÉTODO INDICADOR DE LA MADUREZ RENAL EN PERROS

RESUMEN

El riñón fetal, aunque inmaduro durante su periodo de formación, contribuye a la supervivencia del feto durante su crecimiento. La producción de orina depende de una serie de mecanismos renales, que están directamente influenciados por el volumen y la composición de los fluidos corporales del feto y por la disponibilidad materna de agua y electrolitos. El objetivo de este estudio fue evaluar la madurez renal mediante la identificación de proteínas de bajo peso molecular y de alfa-fetoproteína utilizando electroforesis en SDS-PAGE (12%). Por medio de cesárea, fueron obtenidas 40 muestras de líquido amniótico y alantoideo de 16 perras gestantes. La densidad óptica integrada (IOD) de la banda de la proteína de 66kDa, considerada como la alfa-fetoproteína, fue 15,94 para el líquido amniótico y 13,3 para el alantoideo. Cinco bandas de proteínas presentes en ambos fluidos pueden expresar la madurez renal (32, 30, 28, 20 y 12). Con base en la información y en los datos estadísticos obtenidos con el experimento se puede afirmar que la concentración de proteínas en los fluidos amniótico y alantoideo es un indicador viable para la evaluación de la madurez renal en fetos caninos ($p < 0,05$).

Palabras clave: madurez renal, líquidos fetales, proteínas, perros.

INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, a avaliação dos fluidos fetais tem sido estudada nas espécies bovina (1), caprina (2), ovina (3, 4) e canina (5-7), bem como em espécies silvestres, *Kerodon rupestris* (8), na busca por informações sobre os componenste bioquímicos e a fisiologia da maturação fetal.

A determinação pré-natal da maturidade fetal é importante, principalmente, nos casos de gestação de alto risco, quando a idade gestacional não é conhecida, em casos de cesarianas, ou ainda, quando a gestação é mantida pela aplicação de progesterona exógena (9).

O rim fetal, embora imaturo durante seu período de formação, contribui de forma decisiva para a sobrevivência do conceito no final de seu crescimento. A produção de urina está subjugada a uma série de mecanismos renais, os quais são influenciados diretamente pelo volume e composição dos fluidos corpóreos do feto e pela disponibilidade de água e eletrólitos maternos (10).

A determinação de microglobulinas vesicais, é útil na avaliação da função renal do feto, sendo confirmado pela presença de microglobulinas no fluido amniótico (11). A coleta do material pode ser realizada no momento da cesariana (8) ou mesmo durante a gestação com auxílio de exame ultrassonográfico (12). As microglobulinas vesicais apresentam baixa massa molecular, variando de 10 a 30 kDa, sendo facilmente reabsorvidas no tubulo proximal. Com o avanço da gestação, as células do túbulo proximal aumentam a capacidade de absorção, o que favorece a transferência destas proteínas para o ambiente amniótico. Assim, a maturidade

renal pode ser definida pelo aumento da filtração glomerular e pela avaliação da maturidade das células tubulares mediante o transporte de diversas moléculas (13).

A alfa-fetoproteína (AFP) é uma glicoproteína presente no sangue fetal, de massa molecular média de 66kDa, sintetizada pelo saco vitelino e, posteriormente, pelo trato gastrointestinal e fígado do feto, tanto em humanos quanto nos animais (14, 15). Alguns autores afirmam que a alfa-fetoproteína está altamente relacionada com a maturidade do conceito, visto que passa da urina fetal para o líquido amniótico (15-18).

Os valores fisiológicos da AFP estão relacionados com a metodologia utilizada para sua detecção, no entanto, sua função biológica específica ainda é desconhecida (15,18).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a maturidade renal pela mensuração da concentração de proteínas totais, determinação de proteínas de baixa massa molecular e alfa-fetoproteínas nos fluidos amnióticos e alantoideanos de cadelas, além de propor parâmetros fisiológicos que possam ser úteis na clínica obstétrica nesta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas 40 amostras de 16 cadelas gestantes submetidas à cesariana no Setor de Obstetrícia de Pequenos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu – SP. A idade gestacional foi determinada pela avaliação ultrassonográfica⁵, sinais clássicos de início de parto e aparência dos fetos. A raça, peso e idade das cadelas não foram levadas em consideração visto que a unidade de estudo foram os fetos com os anexos embrionários.

Para a colheita das amostras, realizou-se primeiramente, a dissecação da membrana corioalantoideana e amniótica para identificação adequada dos fluidos. O material em duplicata foi armazenado em tubos plásticos de 1,5ml, previamente identificados. Antes de cada procedimento, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm, durante uma hora, à -4°C. Uma alíquota foi separada para avaliação da densidade óptica em espectrofotômetro, enquanto as demais amostras foram armazenadas em freezer à -20°C para dosagem de proteínas totais e realização da eletroforese.

A concentração de proteínas totais das amostras de fluidos fetais foi obtida pela metodologia de Bradford modificado⁶. Neste método, as proteínas presentes reagem com o corante Coomassie azul brilhante e as variantes do azul encontradas são correlacionadas com as concentrações proteicas. O ponto de máxima absorção foi a 610 nm ou filtro laranja, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro colorimétrico⁷ e os resultados expressos em mg/dL.

A determinação das massas proteicas foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% acrescida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (10) e referendado para os líquidos fetais caninos por Barreto (5). Proteínas de massa molecular inferior a 40kDa foram consideradas indicativas de funcionalidade renal devido a falta de dados em cães, e as próximas de 66kDa foram consideradas como alfa-fetoproteína.

Durante o procedimento, foram aplicadas em cada gel, amostras dos líquidos amniótico e alantoideano e um marcador de baixa massa molecular⁸ 10 a 250kDa. As amostras com indícios de contaminação com mecônio ou sangue foram excluídas.

Para a confecção dos géis e corrida eletroforética utilizou-se duas placas de vidro, previamente limpas com álcool etílico a 96%, medindo 10x8cm, montadas em justaposição e separadas por espaçador de polietileno com 1,0mm de espessura.

⁵ Scanner 240 – Pie Medical

⁶ Micropote – DOLES reagentes

⁷ B582, Micronal, Brasil

⁸ Rainbow Molecular Weight Markers- Amersham Pharmacia Biotech

Após a montagem da cuba eletroforética⁹, o gel de separação foi preparado e vertido entre as placas de vidro. A polimerização do gel ocorreu entre 15 a 30 minutos. Durante este intervalo, as amostras adicionadas com 5mg/μL de proteína total dos líquidos amniótico e alantoideano, foram diluídas em tampão da amostra, na proporção de 1:4 e fervidas à ±100°C, durante 10 minutos.

Posteriormente, o gel de empilhamento a 5% foi preparado e vertido sobre o gel de separação. Um molde de polietileno, em forma de pente, foi acomodado sobre o gel de empilhamento para formar canaletas que permitiam a aplicação das amostras. Após a polimerização do gel, foi adicionado o tampão de corrida já diluído na proporção de 1:4 (tampão:água) e as placas foram colocadas na cuba de corrida de eletroforese. Finalmente, as amostras foram aplicadas às canaletas do gel, com exceção de uma canaleta específica, onde foi aplicado uma alíquota do marcador de massa molecular, com intuito de identificar e comparar as bandas proteicas.

A cuba foi ligada a uma fonte estabilizadora para Eletroforese¹⁰ com miliamperagem constante de 24mA (12mA/gel) e voltagem máxima de 244V, por um período médio de duas horas.

Após a corrida eletroforética, o gel foi retirado das placas de vidro e corados, inicialmente, com corante Coomassie azul brilhante, para verificar a separação, e então descorados e corados novamente com nitrato de prata, para avaliação das bandas protéicas. As imagens dos géis foram obtidas por um capturador de imagens¹¹, e posteriormente, armazenadas na geladeira à 4°C, em vasilhas plásticas com água MilliQ.

A leitura da imagem digitalizada foi realizada no Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu – SP, utilizando-se analisador de imagens com software¹² específico, que demonstra a massa protéica e a densidade óptica integrada (IOD) de cada banda

Os dados obtidos nos métodos propostos foram submetido à estatística descritiva (média e desvio padrão) e representados em forma de tabelas. As diferenças que apresentaram probabilidade de significância menor que 5% foram consideradas significativas para o teste-t. As análises foram executadas por meio do Proc Mixed, SAS versão 6.12. Na avaliação das densidades ópticas integradas e das massas das bandas protéicas foi efetivado cálculo de medidas descritivas (média e desvio padrão) com o auxílio do excel.

RESULTADOS

Os valores de média e desvio-padrão para proteínas totais encontradas no líquido amniótico (n=40) e alantoideano (n=40) de cadelas gestantes (n=16) foi de 22,29 mg/dl, ± 16,19 e 37,86mg/dl, ± 12,52, respectivamente. Os valores encontrados apresentaram diferença significativa (p<0,05).

As bandas proteicas presentes no gel de eletroforese, com massa molecular próxima a 66 kDa, apresentou grande variação nos valores máximos e mínimos para a IOD, como observado na Tabela 1. Além disso, constatou-se que em várias amostras de líquido amniótico e alantoideano, as bandas proteicas estavam ausentes.

Tabela 1. Valores médios, mínimos e máximos da Densidade Óptica Integrada (IOD) da banda protéica de massa próxima a 66kDa, presente no líquido amniótico (35/40) e alantoideano (27/40) de cadelas gestantes (n=16).

| | Líquido Amniótico | Líquido Alantoideano |
|--|-------------------|----------------------|
|--|-------------------|----------------------|

⁹ Hoefer MiniVE Vertical Electrophoresis System - Amersham Pharmacia Biotech

¹⁰ EPS 300 Power Supply – Amersham Pharmacia Biotech

¹¹ HpScanjet 3200C

¹² Image Master VDS and Analysis Software – Amersham Pharmacia Biot

| | (n=35) | (n=27) |
|-----------------|--------|--------|
| Média | 15,94 | 13,3 |
| Valores Mínimos | 1,15 | 0,48 |
| Valores Máximos | 95,95 | 60,25 |

As massas e a IOD das bandas das proteínas de baixa massa, presentes nos líquidos amniótico e alantoideano, obtidas pela técnica de eletroforese em SDSPAGE (12%) estão descritas na Tabela 2 e demonstradas na Figura 1.

Tabela 2. Média da Densidade Óptica Integrada (I.O.D.) das bandas proteicas (kDa) das proteínas de baixa massa, observadas no gel de separação (12%) presentes nas amostras (n) de líquido amniótico e alantoideano de cadelas gestantes (n=16).

| Bandas proteicas kDa | I.O.D. | |
|----------------------|-----------------------|--------------------------|
| | Líquido Amniótico (n) | Líquido Alantoideano (n) |
| 40 | 56,95 (16) | 105,66 (4) |
| 38 | 103,18 (13) | 132,24 (12) |
| 36 | 51,72 (1) | 65,59 (12) |
| 35 | 65,32 (2) | 159,68 (3) |
| 34 | 193,91 (34) | 42,15 (15) |
| 33 | 65,71 (11) | 39,54 (15) |
| 32 | 61,72 (26) | 43,09 (29) |
| 31 | --- | 22,62 (5) |
| 30 | 62,67 (33) | 69,82 (32) |
| 29 | 35,51 (19) | 26,89 (8) |
| 28 | 12,75 (28) | 27,62 (26) |
| 27 | 8,55 (8) | 17,69 (2) |
| 26 | 8,54 (5) | 25,09 (28) |
| 25 | 6,15 (4) | 6,38 (4) |
| 24 | 11,52 (26) | 17,74 (12) |
| 23 | 15,89 (2) | 2,84 (3) |
| 22 | 15,5 (32) | 7,71 (14) |
| 21 | 3,23 (1) | --- |
| 20 | 36,32 (26) | 28,57 (24) |
| 19 | --- | 12,73 (5) |
| 18 | 25,88 (19) | 45,88 (11) |
| 17 | 47,68 (13) | 28,29 (1) |
| 16 | 14,97 (1) | 63,27 (23) |
| 15 | 43,74 (15) | 37,93 (1) |
| 14 | 68,84 (11) | 46,85 (21) |
| 13 | 43,18 (24) | 49,33 (1) |
| 12 | 43,08 (38) | 66,14 (26) |
| 10 | 17,44 (34) | 41,27 (16) |
| 9 | --- | 51,76 (6) |
| 8 | 8,01 (19) | 14,64 (14) |

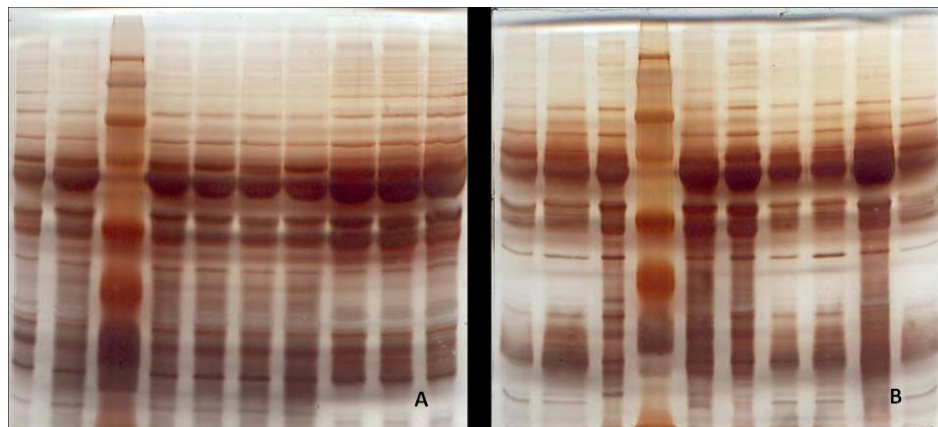


Figura 1. SDS-PAGE das amostras de líquido amniótico (A) e alantoideano (B) de cadelas gestantes (n=16). A massa molecular das bandas proteicas foi expressa em kDa com padrão de massa molecular (M.P.M.).

DISCUSSÃO

Foram coletadas um total de 52 amostras de fluidos fetais de 16 cadelas, porém algumas apresentaram volume insuficiente para as análises propostas. Das 52 amostras somente em 40 foram observadas paridade entre fluidos (amniótico:alantoideano) e volume adequado.

Dos elementos bioquímicos presentes nos fluidos fetais, as proteínas são encontradas em maior abundância e participam ativamente da formação celular e tecidual (17, 19). A concentração média de proteínas totais do líquido amniótico ($22,29 \pm 16,19$) e alantoideano ($37,86 \pm 12,52$) ($p < 0,05$) refletem a fisiologia diferenciada nos dois compartimentos fetais. Os valores observados nos fluidos convergem com os dados apresentados em trabalhos anteriormente realizados (6, 20).

Já a dosagem de alfa-fetoproteína (AFP) pode ser utilizada como meio diagnóstico para se detectar alterações no fechamento do tubo neural e na funcionalidade renal (21-23). Os valores propostos para a massa molecular das alfa-fetoproteínas em humanos e em cães é de 69kDa (18) e de 66kDa (14), respectivamente. Como as concentrações registradas estão altamente correlacionadas com a técnica de dosagem utilizada (15) e com a sensibilidade do teste (14) podem ocorrer divergências de dados.

Das 40 amostras analisadas, a banda proteica de 66kDa estava presente em 35 amostras de líquido amniótico e em 27 amostras de líquido alantoideano. Foi observada a presença desta proteína em pelo menos um dos líquidos de todos os fetos, o que contrribuiu para reafirmar a utilidade das alfa-fetoproteínas na avaliação da maturidade fetal em cães.

A presença de proteínas de massa molecular baixa também são indicativas de funcionalidade renal (11). Foram detectadas 30 bandas proteicas com massa molecular abaixo de 40kDa, assim, para considerá-las como indicadoras da maturidade renal, foi avaliada a densidade óptica integrada das bandas que estavam presentes em pelo menos metade mais um das amostras, ou seja, 16 amostras.

Não foi realizada correlação das bandas entre os líquidos, visto que podem ser bandas proteicas de massa semelhante, mas eventualmente são bandas diferentes.

Das 30 bandas detectadas, três não estavam presentes no líquido amniótico (31; 19 e 9kDa) e uma no alantoideano (21kDa). A banda de massa molecular de 12kDa foi identificada em 38 das 40 amostras de líquido amniótico, sendo acompanhada das bandas 34 e 10kDa, que estavam presentes em 34 amostras. No líquido alantoideano a banda de massa 30kDa foi detectada em 32 das 40 amostras avaliadas, já a de 32kDa foi encontrada em 29 amostras.

Das 27 bandas detectadas no líquido amniótico, dez estavam presentes em 24 amostras, enquanto das 29 bandas encontradas no líquido alantoideano, oito estavam presentes em mais

de 20 amostras. A presença de bandas protéicas de mesma massa molecular, em várias amostras, contribui para esclarecer a atividade metabólica do concepto, a comunicação dos dois compartimentos com a circulação fetal e o processo de formação dos fluidos fetais.

Algumas bandas só foram identificadas em amostras específicas, como a de 36, 21 e 16kDa no líquido amniótico e a de 17 e 13kDa no alantoideano. Este fato pode ser atribuído às particularidades do feto, visto que foram em amostras de cinco fetos diferentes.

Cinco bandas protéicas presentes nos dois fluidos apresentam maior relação com a maturidade renal, visto que foram detectadas em mais de 20 amostras (32; 30; 28; 20 e 12).

Cada gel utilizado permitia a visibilização das bandas protéicas com diferentes contrastes, assim foi realizada uma comparação adequada, o que reduziu as possibilidades de erros na interpretação.

CONCLUSÃO

A banda de massa molecular de 66 kDa (alpha-fetoproteína) foi detectada em pelo menos um dos dois líquidos estudados em cada feto, podendo refletir a fisiologia fetal e cinco bandas protéicas presentes em ambos os fluidos podem espelhar a maturidade renal, pois foram detectadas em mais de 20 amostras (32; 30; 28; 20 e 12) demonstrando que a concentração proteica dos fluidos fetais é um indicador viável da maturidade renal de cães.

REFERÊNCIAS

1. Lindqvist A, Akerstrom B. Bovine alpha 1-microglobulin/bikunin. Isolation and characterization of liver cDNA and urinary alpha 1-microglobulin. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1:98-106.
2. Aidasani R, Pieterse ME, Vanderweyden GG, Taverne MAM. Some metabolic constituents of caprine foetal fluids and foetal serum. *J Anim Sci*. 1992;62:335-6.
3. Prestes NC, Chalhoub M, Lopes MD, Takahira RK. Amniocentesis and biochemical evaluation of amniotic fluid in ewes at 70, 100 and 145 days of pregnancy. *Small Rumin Res*. 2001;39:277-81.
4. Nitsos I, Moss TJM, Cock ML, Harding R, Newnham JP. Fetal responses to intra-amniotic endotoxin in sheep. *J Soc Gynecol Investig*. 2002;9:80-5.
5. Barreto CS. Avaliação bioquímica, citológica e do perfil eletroforético de proteínas no líquido amniótico e alantoideano de cadelas entre 30 a 40 dias da gestação e no momento do parto [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2002.
6. Veronesi MC, Battocchio M, Marinelli L, Faustini M, Kindahl H, Cairoli F. Correlations among body temperature, plasma progesterone, cortisol and prostaglandin F2 α of the periparturient bitch. *J Vet Med*. 2002;49:264-8.
7. Olsson K, Bergstrom A, Kindahl H, Lagerstedt AS. Increased plasma concentrations of vasopressin, oxytocin, cortisol and the prostaglandin F2 α metabolic during labour in the dog. *Acta Physiol Scand*. 2003;179:281-7.

8. Zogno MA, Miglino MA, Oliveira MF. Análise bioquímica dos líquido fetais e citologia do fluido amniótico da fêmea de Mocó (*Kerodon rupestris*). *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2004;41:228-35.
9. Lopate C. Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: a review. *Theriogenology*. 2008;70:397-402.
10. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 1970;277:680-5.
11. Lumbers ER, Smith FG, Stevens AD. Measurement of net transplacental transfer of fluid to the fetal sheep. *J Physiol*. 1985;364:289-99.
12. Çagdas A, Aydinli K, Irez T, Temizyrek K, Apak M. Evaluation of the fetal kidney maturation by assessment of amniotic fluid alpha-1 microglobulin levels. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000;90:55-61.
13. Ferreira GJ, Carvalho AF, Branco E, Cabral R, Gregores GB, Fioretto ET, et al. Chorion biopsy in mongrel dogs. *Pesqui Vet Bras*. 2009;29:793-6.
14. Oliveira FR, Barros EG, Magalhães JA. Biochemical profile of amniotic fluid for the assessment of fetal and renal development. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:215-22.
15. Yamada T, Kakinoki M, Totsuka K, Ashida Y, Nishizono K, Tsuchiya R, et al. Purification of canine alpha-fetoprotein and alpha-fetoprotein values in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995;47:25-33.
16. Campana SG, Chávez JH, Hass P. Diagnóstico laboratorial do líquido amniótico. *J Bras Patol Med Lab*. 2003;39:215-8.
17. Belfort P, Orlandi OV. Placenta e anexos. In: *Medicina perinatal*. São Paulo: Manole; 1983. p.14-51.
18. Kjeldsberg C, Knight J. Body fluids: laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, serum and synovial fluids. In: *American society of clinical pathology*. Chicago: Third Ed.; 1993. p.130-58.
19. Maestri D, Sansaverino MTV, Cheinquer N, Correia MCM, Kessler RG, Azevedo Magalhães JA. Alfetoproteína: valores normais no líquido amniótico entre 14 e 21 semanas. *Rev Assoc Med Bras*. 1998;44:273-6.
20. Moore KL, Persaud TVN. Placenta e membranas fetais. In: *Embriologia clínica*. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.233-88.
21. Branco ER, Ferreira GJBC, Samoto VY, Miglino MA. Aspectos bioquímicos de líquidos fetais de cães SRD (*Canis familiaris*-Linnaeus, 1758) [CD-ROM]. In: *Anais do 16o Congresso Brasileiro de Reprodução Animal; 2005, Goiânia*. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; 2005.
22. Gordon ED, Ferrá MC. Registro, incidencia y diagnóstico prenatal de las malformaciones congénitas mayores más severas. *Rev Cuba Med Gen Integr*. 1999;15:403-8.

23. Newby D, Dalglish G, Luall F, Aitken DA. Alphafetoprotein and alphafetoprotein receptor expression in the normal human placenta at term. *Placenta*. 2005;26:190-200.

Recebido em: 29/07/10

Aceito em: 03/05/12

EFEITO DE MEIOS DILUENTES NA VIABILIDADE DE SÊMEN CONGELADO BOVINO

Marcelo George Mungai Chacur¹
Huberson Sanches Dias²
Frederico Ozanam Papa³
Bruno Alves Louvison⁴
Mayra Micarelli Calesco⁴
Patrícia de Mello Papa⁴

RESUMO

O aumento da produtividade na pecuária pode ser adquirido com o emprego de biotécnicas como a inseminação artificial. O objetivo deste trabalho foi testar a viabilidade de novos meios de congelamento de sêmen para touros classificados como de muito boa e regular congelabilidade. Foram utilizados 10 touros zebuínos, sendo classificados como de muito boa (n=5) e regular (n=5) congelabilidade. Os ejaculados foram congelados com os meios: TRIS-gema, Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] e avaliados pela análise computadorizada (CASA) e integridade da membrana por fluorescência. A estatística foi realizada por ANOVA e teste de Tukey a 5%. Não houve diferença (p>0,05) entre os touros de muito boa e regular congelabilidade, na pré-congelamento. Houve superioridade dos diluentes Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] (p<0,05) para CASA: MP, ALH, BCF, STR, LIN e RAP, para touros de regular congelabilidade. Os touros de regular congelabilidade apresentaram superioridade (p<0,05) no Botu-Bov Egg Free[®] sobre o Botu-Bov[®] nos parâmetros MT e VSL. Houve superioridade dos diluentes Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] (p<0,05) nos parâmetros BCF e STR em touros de muito boa congelabilidade. Os meios Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] apresentaram superioridade na maioria dos parâmetros avaliados pelo CASA, principalmente em touros de regular congelabilidade.

Palavras-chave: touros, espermatozóide, criopreservação, CASA, integridade de membrana.

EFFECT OF DIFFERENT EXTENDERS ON VIABILITY OF BOVINE FROZEN SEMEN

ABSTRACT

The increase number in the livestock can be acquired with the use of bio techniques as artificial insemination. The aim of this study was to test the viability of new extenders of freezing semen for bulls classified as very good and regular freezability. Ten zebu bulls was used, being classified as very good freezability (n=5) and regular one (n=5). The ejaculates were frozen using the extenders TRIS-egg yolk, Botu-Bov[®] and Botu-Bov Egg Free[®]; evaluated by computer analysis (CASA) and the membrane integrity by fluorescence. The statistics was realized by ANOVA and Tukey test at 5%. No difference (p>0.05) between bulls of very good and regular frozen, pre-freeze was found in the tests. However, there was the superiority of Botu-Bov[®] and Botu-Bov Egg Free[®] (p<0.05) for CASA: MP, ALH, BCF,

¹ Professor do Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias – FCA, Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Campus II, Hospital Veterinário, CEP 19067-175. Presidente Prudente, SP/Brasil, chacur@unoeste.br tel: (18) 3229-2077, FAX: (18) 3229-2080.

² Mestre em Ciência Animal pela UNOESTE (ex-orientado), Presidente Prudente - SP

³ Professor do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ-UNESP, Botucatu-SP.

⁴ Ex-orientados de Iniciação Científica, Medicina Veterinária - UNOESTE, Presidente Prudente - SP

STR, LIN and RAP for regular freezability. The bulls that have regular freezability also presented superiority ($p < 0.05$) to Botu-Bov Egg-Free[®] and Botu-Bov[®] in the MT and VSL parameters. There was also the superiority of Botu-Bov[®] and Botu-Bov Egg Free[®] ($p < 0.05$) in BCF and STR parameters used in bulls of very good freezability. The extenders Botu-Bov[®] and Botu-Bov Egg Free[®] presented superiority in most parameters that were analyzed using the system CASA, mainly in bulls with regular freezability.

Keywords: bulls, spermatozoa, cryopreservation, CASA, membrane integrity.

EFECTO DE DISOLVENTES SOBRE LA VIABILIDAD DE SEMEN DE BOVINO CONGELADO

RESUMEN

El aumento de la productividad pecuaria puede ser logrado con el uso de biotécnicas como la inseminación artificial. El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de nuevas medios de congelación de semen de bovino que presenta congelabilidad alta y regular. Fueron utilizados eyaculados de 10 toros cebuinos, clasificados como de congelabilidad alta ($n=5$) y regular ($n=5$). Los eyaculados fueron congelados con los diluyentes TRIS-yema, Botu-Bov[®] y Botu-Bov Egg Free[®] y evaluados por análisis computadorizado (CASA). Así mismo, la integridad de membrana fue evaluada por fluorescencia. Fue realizado análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey al 5%. No hubo diferencia ($p > 0,05$) entre el semen de alta y baja congelabilidad antes de la congelación. Los diluyentes Botu-Bov[®] y Botu-Bov Egg Free[®] se mostraron superiores ($p < 0,05$) ante CASA: MP, ALH, BCF, STR, LIN y RAP para el semen de congelabilidad regular. El semen de congelabilidad regular presentó superioridad ($p < 0,05$) en los parámetros MT y VSL cuando fue usado el diluyente Botu-Bov Egg Free[®] con relación al Botu-Bov[®]. También hubo superioridad de los diluyentes Botu-Bov[®] y Botu-Bov Egg Free[®] ($p < 0,05$) en los parámetros BCF y STR en semen de congelabilidad alta. Los disolventes Botu-Bov[®] y Botu-Bov Egg Free[®] fueron mejores en la mayoría de los parámetros evaluados por CASA, principalmente en semen de congelabilidad regular.

Palabras clave: toros, espermatozoide, crio preservación, CASA, integridad de membrana.

INTRODUÇÃO

O segmento da pecuária bovina, inserido no agronegócio, assume papel de destaque na economia do país pelo elevado potencial e taxa de crescimento. O aumento da produtividade nesse setor pode ser alavancado com o emprego de biotécnicas que melhorem o sistema de produção (1). Neste sentido, a inseminação artificial (IA) é um instrumento importante para contribuir para o avanço das modernas técnicas de produção animal (1, 2).

Durante o processo de criopreservação, ocorre queda de aproximadamente 50% da viabilidade espermática devido aos efeitos osmóticos e térmicos, modificando a estrutura da membrana espermática, bem como da sua fluidez, permeabilidade e composição lipídica (3). Modificações na estrutura e na fluidez da membrana levam os espermatozoides submetidos à congelação/descongelação a sobreviver menos tempo no trato reprodutivo da fêmea em comparação com espermatozoides oriundos do sêmen fresco (4).

A interação entre as células espermáticas e o meio diluidor representa um fator crucial para a preservação da integridade espermática e habilidade de fecundação (5). Um meio diluente eficaz tem como finalidade de proteger a célula espermática durante as alterações térmicas na congelação/descongelação. Os meios diluentes são compostos por açúcares,

crioprotetores, tampões e antibióticos para que seja fornecida nutrição, proteção contra as baixas temperaturas, evitar alterações de pH e inibição do crescimento bacteriano (6).

Parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática como: número total de espermatozoides móveis, motilidade progressiva e morfologia, têm se mostrado limitados quanto à capacidade de estimar o potencial de fertilidade do sêmen. Um único teste é pouco eficaz pelo fato de que cada espermatozoide apresenta múltiplos compartimentos subcelulares com diferentes funções a serem avaliadas (7). A motilidade espermática é geralmente considerada como um importante parâmetro para avaliação da qualidade seminal (8). Testes que avaliam diferentes características do espermatozoide e de vários atributos podem fornecer uma melhor estimativa da fertilidade do que um único teste laboratorial (9).

Usualmente, utilizam-se esses parâmetros convencionais na mensuração da qualidade espermática, podendo haver variações de até 60% nesse tipo de estimativa devido à subjetividade dos critérios e a variação individual do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas de determinada amostra (10). A Análise Computadorizada de Sêmen (CASA) fornece dados detalhados, precisos e com repetibilidade para diferentes parâmetros, relativos à motilidade do sêmen humano ou nas espécies animais. Assim, a CASA oferece uma melhor estimativa da fertilidade, em relação à rotina microscópica (11).

Alguns espermatozoides possuem membrana plasmática menos eficiente em efetuar trocas, sofrendo maiores danos durante a variação osmótica (12). Estudos comprovaram que a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e da função mitocondrial pode ser realizada por técnicas simples, por meio da utilização de sondas fluorescentes (1).

O objetivo deste trabalho foi testar a viabilidade de novos meios de congelamento de sêmen para touros classificados como de alta e regular congelabilidade de sêmen, pertencentes à Central de Inseminação Artificial.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 touros zebuínos pertencentes à Central de Inseminação Artificial, sendo cinco animais classificados como de muito boa congelabilidade (ao menos 80% dos ejaculados aprovados na descongelação) e cinco touros como de regular congelabilidade (ao menos 60% dos ejaculados aprovados na descongelação), considerando-se os parâmetros de motilidade espermática, vigor espermático e morfologia espermática (13, 14).

Na Central de Inseminação, os ejaculados foram colhidos com vagina artificial, diluídos 1:1 com a fração I (sem glicerol) dos diluentes TRIS-gema, Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] e acondicionados em sistemas passivos de transporte de sêmen refrigerado Botutainer[®] e transportados, durante aproximadamente 15 minutos, até o laboratório de Reprodução Animal, onde foram processados.

Conforme informações do fabricante, a lecitina de soja está presente no diluente Botu-Bov Egg Free[®]. O meio Botu-Bov[®] possui gema de ovo na sua composição. O meio TRIS-gema utilizado foi confeccionado com a seguinte formulação (solução mãe): TRIS 12,11g; ácido cítrico 6,8g; frutose (2,5g) + lactose (2,5g); água destilada (completar até 68mL); glicerina (completar até 100mL); gamicina (1:10.000) 0,7mL. Diluidor TRIS para uso imediato: solução mãe 10mL, água destilada 30mL e gema de ovo 10mL.

As amostras de sêmen fresco, antes da diluição acima descrita, foram analisadas quanto às características macroscópicas e microscópicas: volume (mL), motilidade (%), vigor espermático (1 a 5) e turbilhão (1 a 5) e concentração espermática (10^6 /mL). O exame da morfologia espermática foi realizado, por meio de esfregaço corado pelo método de Karras modificado (15).

Para avaliar as diferenças entre os meios diluentes as amostras fracionadas foram acrescidas em 50% do volume com as respectivas frações II dos diluentes (com 13% de

glicerol) padronizando a concentração final em 30×10^6 espermatozóides viáveis (adotando a motilidade espermática como critério), envasadas em palhetas de 0,5mL devidamente identificados os grupos e lacradas com álcool polivinílico. Após o envase e fechamento, as palhetas foram dispostas horizontalmente sobre bandeja de aço telada e submetidas ao período de estabilização, em geladeira automática digital (Minitub[®], Porto Alegre-Brasil) a 5°C por quatro horas.

Após o período de quatro horas, as bandejas com as palhetas foram colocadas a 4 cm do nível do nitrogênio líquido, amparadas por suporte de alumínio e todo o conjunto no interior de uma caixa de isopor (51 x 45 x 45 cm). Após 20 minutos em vapor de nitrogênio as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e após o término do processo de congelação as palhetas foram acondicionadas em raques e colocadas em canisters de um botijão criobiológico.

Decorridos três dias de estocagem em nitrogênio líquido, uma palheta de cada tratamento foi descongelada em banho-maria a 46°C/20 segundos (16). Para uma melhor homogeneização das amostras, o sêmen foi transferido das palhetas para criotubos de 1,5mL (Eppendorf[®]) mantidos a temperatura de 37°C.

Na pós-descongelação, foi realizada a análise computadorizada da motilidade espermática (CASA) com o aparelho fabricado pela “Hamilton Thorne Research”, versão IVOS 10, onde após a descongelação das doses de sêmen uma gota da amostra foi colocada na câmara de Makler aquecida a 38°C, para as análises das variáveis espermáticas. As análises foram realizadas em “setup”, ajustado para as características seminais de bovinos e avaliadas no mínimo três campos de cada amostra. As seguintes variáveis espermáticas foram analisadas: motilidade espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilínea (VCL), deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento da cauda (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e porcentagem de espermatozóides rápidos (RAP).

A análise da integridade da membrana plasmática (IMP) foi realizada com a utilização das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP), sendo diluídos 10µL de sêmen em 40µL da solução de trabalho composta por: 1 mL de citrato de sódio a 2,95%; 10µL de formol salino; 10µL de carboxifluoresceína e 20µL de iodeto de propídio. O material foi analisado entre lâmina e lamínula, em microscópio de epifluorescência (Leika[®]) com aumento de 400X, por excitação em filtro BW. Foram contadas 200 células, sendo consideradas íntegras as coradas totalmente em verde, e lesadas as coradas em vermelho ou em verde e vermelho (13, 14, 17).

Para a análise estatística dos dados relativos ao sêmen na pré-congelação, foram usados o teste t de Student para comparação das médias e o teste não paramétrico de Mann Whitney para análise dos escores. A avaliação estatística dos dados para o sêmen na pós-descongelação foi realizada pela análise de variância (ANOVA). Para as análises utilizou-se nível de significância ($p < 0,05$), sendo utilizado o programa computacional *R Statistical System*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o sêmen fresco, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação aos parâmetros motilidade espermática, volume e vigor espermático (Tabela 1), concentração, defeitos maiores e menores dos espermatozóides (Tabela 2) na pré-congelação, entre os touros com sêmen de muito boa e regular congelabilidade.

Tabela 1. Médias dos parâmetros espermáticos pré-congelação de touros classificados de acordo com o grau de congelabilidade do sêmen em regular (R) e muito boa (MB), pertencentes a central de inseminação artificial.

| | Motilidade (%) | | Volume (mL) | | Vigor (0-5) | |
|--------|----------------|----|--------------|-----|--------------|----|
| | R | MB | R | MB | R | MB |
| | 70 | 80 | 7 | 10 | 3 | 4 |
| | 75 | 80 | 6 | 12 | 5 | 4 |
| | 80 | 80 | 6 | 9 | 3 | 5 |
| | 75 | 75 | 12 | 8,5 | 4 | 4 |
| | 75 | 70 | 4,5 | 5,5 | 4 | 5 |
| Médias | 75,5 | 77 | 7,1 | 9,0 | 4 | 4 |
| | p = 0,45(NS) | | p = 0,34(NS) | | p = 0,25(NS) | |

NS – não significativo.

A alta motilidade espermática inicial, associada ao alto vigor espermático, observados no sêmen fresco, não garantem por si só, bom desempenho no processo de criopreservação, porém permite que o sêmen de touros com altas taxas de queda da motilidade tenha aprovação da partida na pós-descongelção conforme (13, 18, 19). A análise de múltiplos atributos de movimentos espermáticos por meio da técnica CASA e a determinação da viabilidade espermática, por meio de técnicas de análise das membranas citoplasmáticas podem agregar maior sensibilidade à avaliação *in vitro* do sêmen em distintas espécies animais como a bubalina (13, 14) e bovina (19).

Tabela 2. Médias dos parâmetros espermáticos pré-congelção de touros classificados de acordo com o grau de congelabilidade do sêmen em regular (R) e muito boa (MB), pertencentes a central de inseminação artificial.

| | Concentração (x10 ⁶ /mL) | | Morfologia espermática (%) | | | |
|--------|--|------|----------------------------|------|------------------|-----|
| | | | Defeitos Maiores | | Defeitos Menores | |
| | R | MB | R | MB | R | MB |
| | 2300 | 2026 | 4 | 10 | 19 | 4 |
| | 1821 | 2000 | 25 | 15 | 7 | 3 |
| | 1632 | 3060 | 10 | 7 | 17 | 6 |
| | 2804 | 1724 | 18 | 6 | 6 | 15 |
| | 1301 | 2965 | 7 | 14 | 7 | 5 |
| Médias | 1971,6 | 2355 | 12,8 | 10,4 | 11,2 | 6,6 |
| | p = 0,34(NS) | | p = 0,58(NS) | | p = 0,58(NS) | |

NS – não significativo.

Na comparação entre os três meios diluentes utilizados, observam-se os seguintes resultados: os touros com sêmen de congelabilidade regular apresentaram motilidade total (MT) superior ($p < 0,05$) quando se utilizou o diluente Botu-Bov Egg Free[®] ($73,3 \pm 6,6 \mu\text{m/s}$) em relação ao diluente Botu-Bov[®] ($63,8 \pm 12,46 \mu\text{m/s}$) e ao meio TRIS ($59,7 \pm 9,2 \mu\text{m/s}$), assim como a motilidade progressiva (MP) a superioridade ($p < 0,05$) foi apresentada pelo uso dos diluentes Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] ($52,4 \pm 5,3 \mu\text{m/s}$ e $50,5 \pm 11,4 \mu\text{m/s}$), respectivamente, em relação ao TRIS ($38,7 \pm 8,1 \mu\text{m/s}$) (Tabela 3). Comparando os resultados do presente estudo com um experimento semelhante (1) com uso do mesmo meio Botu-Bov[®], se obteve MT e MP superiores em relação ao meio Bioxcell[®]. Essa diferença significativa pode estar relacionada com o aumento da motilidade em diluentes com maior densidade, cuja formulação incluía a gema de ovo (20).

Tabela 3. Médias e desvios-padrões dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento de touros classificados de acordo com o grau de congelabilidade do sêmen em regular e muito boa, pertencentes a central de inseminação artificial.

| | Congelabilidade regular (n=5) | | | Congelabilidade muito boa (n=5) | | |
|-----|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Tris | Botu-Bov® | Botu-Bov Egg Free® | Tris | Botu-Bov® | Botu-Bov Egg Free® |
| MT | 59,7±9,2 ^C | 63,8±12,4 ^{BC} | 73,3±6,6 ^A | 68,9±6,8 ^{AB} | 72,6±6,9 ^{AB} | 71,5±5,1 ^{AB} |
| MP | 38,7±8,1 ^B | 52,4±5,3 ^A | 50,5±11,4 ^A | 46,9±6,0 ^A | 54,1±5,7 ^A | 54,3±3,4 ^A |
| VAP | 98,0±7,8 ^{AB} | 87,1±8,1 ^B | 97,6±10,8 ^{AB} | 99,3±13,8 ^A | 93,4±11,0 ^{AB} | 96,3±9,1 ^{AB} |
| VSL | 74,7±4,8 ^{AB} | 72,7±6,5 ^B | 81,5±9,8 ^A | 76,4±6,2 ^{AB} | 74,9±7,0 ^{AB} | 78,7±9,5 ^{AB} |
| VCL | 160,3±34,0 ^{AB} | 141,5±18,7 ^B | 155,4±19,8 ^{AB} | 171,9±22,1 ^A | 149,0±23,8 ^{AB} | 148,7±19,9 ^{AB} |
| ALH | 6,9±0,8 ^B | 5,6±0,7 ^A | 5,9±0,7 ^A | 6,8±0,6 ^A | 5,8±0,9 ^A | 5,5±0,8 ^A |
| BCF | 25,8±3,7 ^{CD} | 30,1±2,7 ^{AB} | 31,7±3,3 ^A | 24,2±2,8 ^D | 28,0±3,2 ^{BC} | 31,1±3,3 ^{AB} |
| STR | 76,7±4,7 ^{BC} | 83,6±3,3 ^A | 84,1±3,3 ^A | 75,4±3,6 ^C | 80,6±4,1 ^{AB} | 82,9±3,7 ^A |
| LIN | 46,4±4,9 ^B | 54,2±5,2 ^A | 54,9±4,1 ^A | 46,1±3,0 ^A | 53,3±5,2 ^A | 56,2±5,4 ^A |
| RAP | 55,8±9,5 ^B | 64,9±8,8 ^A | 61,6±14,1 ^A | 70,2±7,8 ^A | 66,5±9,6 ^A | 69,3±5,5 ^A |
| IMP | 29,5±7,4 | 31,9±9,4 | 35,3±10,7 | 33,7±5,8 | 33,7±6,4 | 32,6±6,5 |

MT (motilidade total, $\mu\text{m/s}$), MP (motilidade progressiva $\mu\text{m/s}$), VAP (velocidade de trajeto $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade linear $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea $\mu\text{m/s}$), ALH (deslocamento lateral da cabeça, μm), BCF (frequência de batimento de cauda, Hz), STR (retilinearidade, %), LIN (linearidade, %), RAP (porcentagem de sptz rápidos), IMP (integridade da membrana plasmática, %).

Letras diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$).

Para a velocidade de trajeto (VAP) e a velocidade curvilínea (VCL), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) tanto nos touros de muito boa quanto de regular congelabilidade do sêmen. Em relação à velocidade linear (VSL), o diluidor Botu-Bov Egg Free® (81,5±9,8 $\mu\text{m/s}$) foi superior ($p < 0,05$) em touros com sêmen de congelabilidade regular sobre o diluidor Botu-Bov® (72,7±6,5 $\mu\text{m/s}$). Vale salientar que para fins de extrapolação para uso prático, os parâmetros de movimentação espermática por meio da análise computadorizada (CASA), estão relacionados com a taxa de fecundação, onde valores de VAP, VSL e a velocidade curvilínea (VCL) são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fecundados (10). Entre os parâmetros cinéticos fornecidos pelo CASA, a VCL e o deslocamento lateral de cabeça dos espermatozoides (ALH) têm mostrado grande correlação com a taxa de fecundação *in vitro* de oócitos (10).

A ALH para o diluente TRIS foi significativamente inferior ($p < 0,05$) em relação aos meios testados em touros com sêmen de congelabilidade regular (6,9±0,8 μm), com o Botu-Bov® (5,6±0,7 μm) e Botu-Bov Egg Free® (5,9±0,7 μm). Uma maior ALH é caracterizada por movimentos espermáticos que resultam na elevação do gasto de energia dos espermatozoides durante o deslocamento (10). Estudos com os diluidores “Talp” e “Cue” comprovaram que tais diluidores promoveram alta motilidade espermática, pois são compostos por partículas livres de baixa viscosidade, porém podem causar maior movimento lateral de cabeça (21).

Para a frequência de batimento de cauda (BCF) e retilinearidade (STR), respectivamente, os resultados foram: Botu-Bov® (regular congelabilidade: 30,1±2,7 Hz; 83,6±3,3%; e alta congelabilidade: 28,0±3,2 Hz; 80,6±4,1%) e Botu-Bov Egg Free® (regular congelabilidade: 31,7±3,3 Hz; 84,1±3,3%; e muito boa congelabilidade: 31,1±3,3 Hz; 82,9±3,7%), sendo superiores ($p < 0,05$) em relação ao meio TRIS para os mesmos parâmetros de movimento espermático, sendo: TRIS (regular congelabilidade: 25,8±3,7 Hz; 76,7±4,7%; e muito boa congelabilidade: 24,2±2,8 Hz; 75,4±3,6%), segundo Hoflack et al. (8) valores

elevados para BCF e STR, resultam em movimentos espermáticos progressivos mais rápidos, devido a maior força propulsora do gameta masculino.

No tocante a linearidade (LIN) e percentagem de espermatozóides rápidos (RAP), os diluidores Botu-Bov[®] (54,2±5,2%; 64,9±8,8%) e Botu-Bov Egg Free[®] (54,9±4,1%; 61,6±14,1%) apresentaram melhores resultados ($p < 0,05$) em touros com sêmen de regular congelabilidade, em relação ao meio TRIS (46,4±4,9%; 55,8±9,5%). Verstegen et al. (10) encontraram para os parâmetros BCF e LIN correlação positiva com a taxa de prenhez, podendo fornecer informações úteis para o uso do sêmen nas fêmeas. Superioridade para BCF, STR e LIN foi descrita por Crespihlo et al. (22) para o sêmen bovino congelado com o diluidor Botu-Bov[®] o que indica que os espermatozóides criopreservados com esse diluidor apresentam movimentos com linearidade superior quando comparada com o diluidor TRIS-gema de ovo-frutose. Resultados esses do presente estudo semelhantes aos relatados por Verberckmoes et al. (23) para VSL, BCF, STR e LIN com maior vigor e retilinearidade dos espermatozóides usando o diluidor CEP-2 com composição bioquímica sintética associada ao plasma da cauda do epidídimo de bovino.

A integridade da membrana plasmática dos espermatozóides avaliada pelas sondas fluorescentes: iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína, não apresentou diferenças significativas entre os três diluidores. Dessa forma, os diluidores revelaram ser adequados, mantendo a integridade da membrana. Ao se tratar de IMP dos espermatozóides a técnica com uso de sondas fluorescentes traz informações importantes para a avaliação do funcionamento das membranas espermáticas (17, 24). Os resultados observados em relação à motilidade e a preservação da integridade das membranas indicam que ocorrem interações entre o diluidor e o tempo de equilíbrio que resultam em uma maior sobrevivência espermática (25).

No presente estudo, obteve-se resultado semelhante ao de outros autores (22) com a associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo para avaliar a IMP dos espermatozóides na pós-descongelação usando os meios diluentes Botu-Bov[®] e TRIS-gema de ovo-frutose. Thun et al. (26) obtiveram diferença significativa com superioridade dos diluentes à base de gema de ovo em relação aos meios à base de lecitina de soja. Na espécie bubalina, pesquisadores brasileiros fizeram uso de meios a base de glicina-gema, Triladyl[®] (Merck) e TES, sendo que a integridade das membranas espermáticas não apresentou diferenças entre os três diluidores para os tempos de equilíbrio de 2 e 4 horas com as sondas IP e CFDA (13, 14).

A despeito das diversas pesquisas realizadas com novos componentes em meios diluidores para fins de criopreservar sêmen na espécie bovina, há necessidade de novos estudos enfocando as interações desses constituintes com os espermatozóides. Vale salientar a necessidade de se padronizar meios diluentes para o uso em reprodutores de regular congelabilidade viabilizando o uso do sêmen congelado desses animais.

CONCLUSÕES

Conclui-se que os diluentes Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®] apresentaram superioridade na maioria dos parâmetros avaliados pelo CASA, principalmente em touros de regular congelabilidade de sêmen; constituindo duas novas opções viáveis de meios diluentes para a congelação de sêmen em touros considerados como de regular congelabilidade; os quais passam a ser significativos em relação aos touros classificados como de muito boa congelabilidade do sêmen, proporcionando o uso do material genético desses animais para fins de reprodução.

AGRADECIMENTOS

A Tairana, Central de Inseminação Artificial.

O presente projeto de pesquisa tramitou junto ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), sendo protocolado sob o número 045/07 cujo parecer foi emitido na data de 16/08/2007 sendo o mesmo APROVADO.

REFERÊNCIAS

1. Celeghini ECC. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2005.
2. Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.* 2000;21:1-7.
3. Thomas CA, Garner DL, Dejarnette JM. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod.* 1998;58:786-93.
4. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;60:481-92.
5. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod.* 2002;67:1250-8.
6. Graham JK. Response of spermatozoa to freezing. In: *Proceedings of the Techniques for Handling and Utilization of Transported Cooled and Frozen Equine Spermatozoa; 1995, Colorado.* Colorado: Colorado State University - Fort Collins; 1995. p.83-95.
7. Santos GCJ. Viabilidade de sêmen equino congelado em meios diluidores de diferentes composições [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.
8. Hoflack G, Opsomer G, Rijsselaere T. Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein-Friesian bulls. *Reprod Domest Anim.* 2007;42:153-61.
9. Schenk JL, Amann RP, Allen CH. Effects of extender and insemination dose on postthaw quality and fertility of bovine sperm. *J Dairy Sci.* 1987;70:1458-64.
10. Verstegen J, Iguer-Ouada MI, Oclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 2002;57:149-79.
11. Farrell PB, Foote RH, McArdle MM. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J Androl.* 1996;17:293-300.
12. Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrossome, morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl.* 2001;22:278-83.

13. Chacur MGM. Avaliação da congelação de sêmen bubalino com os diluidores Glicina-Gema, Tryladil® e TES em diferentes tempos de equilíbrio [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 1996.
14. Chacur MGM, Oba E, Gonzalez CIM. Equilibrium time influence on motility, vigor and membrana integrity of thawed buffalo semen using Triladyl, glycine-egg-yolk and TES extenders. In: Proceedings of the 5th World Buffalo Congress; 1997, Caserta. Caserta: WBC; 1997. p.846-9.
15. Papa FO, Alvarenga MA, Carvalho IM, Bicudo SD. Coloração espermática segundo Karras modificada pelo emprego do Barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). Arq Bras Med Vet Zootec. 1988;40:115-23.
16. Dell'aqua Junior JA. Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado equino [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2000.
17. Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. J Reprod Fertil. 1990;88:343-52.
18. Salvador DF, Andrade VJ, Vale Filho VR. Associação entre o perfil andrológico e a congelação de sêmen de touros da raça Nelore aos dois anos de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos (CAP). Arq Bras Med Vet Zootec. 2008;60:587-93.
19. Crespilho AM. Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF) [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2007.
20. Hirai M, Cerbito WA, Wijayaguna W. The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. Theriogenology. 1997;47:1463-78.
21. Foote RH, Gray LC, Young DC. Fertility of bull semen stored up to four days at 5° in 20% egg yolk extenders. J Dairy Sci. 1960;43:1330.
22. Crespilho AM, Papa FO, Alberti K. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. Ars Vet. 2006;22:229-35.
23. Verberckmoes S, Soom AV, Dewulf J. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. Theriogenology. 2005;63:912-22.
24. Garner DL, Pinkel D, Johnson LA. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. Biol Reprod. 1986;34:127-38.
25. Leite TG. Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.

26. Thun R, Hurtado M, Janet F. Comparison of Biociphos-Plus® and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 2002;57:1087-94.

Recebido em: 25/04/11

Aceito em: 10/05/12

QUALIDADE ÓSSEA DE POEDEIRAS COMERCIAIS LEVES ALIMENTADAS COM RAÇÕES SUPLEMENTADAS COM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS¹

Ana Beatriz Garcia Faitarone^{2,*}
Edivaldo Antonio Garcia³
Silvana Martinez Baraldi Artoni⁴
Sarah Sgavioli⁵
Maeli Dal Pai Silva⁶
Heraldo César Gonçalves⁷
Kleber Pelícia⁸

RESUMO

O presente experimento, com 112 dias de duração, foi conduzido com o objetivo de estudar o efeito da adição de óleos vegetais, fontes de ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 na dieta, sobre a qualidade óssea de poedeiras comerciais leves. Foram utilizadas 50 poedeiras comerciais brancas da linhagem Lohmann LSL, submetidas a 10 tratamentos experimentais (T1 – Controle; T2 – inclusão de 2,5% de óleo de linhaça na dieta; T3 – inclusão de 2,5% de óleo de canola na dieta; T4 – inclusão de 2,5% de óleo de soja na dieta; T5 – inclusão de 5% de óleo de linhaça na dieta; T6 – inclusão de 5% de óleo de canola na dieta; T7- inclusão de 5% de óleo de soja na dieta; T8 – inclusão de 2,5% de óleo de linhaça +2,5% de óleo de soja na dieta; T9 – inclusão de 2,5% de óleo de canola + 2,5% de óleo de soja na dieta e T10 – inclusão de 2,5% de óleo de linhaça + 2,5% de óleo de canola na dieta). As características avaliadas foram: resistência óssea à quebra e densidade mineral óssea. Pela análise histológica das tíbias, realizou-se contagem de osteoclastos e mensurou-se a espessura de osso compacto e da área ocupada por osso esponjoso. Empregou-se um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 10 tratamentos (diferentes inclusões lipídicas), sendo 5 repetições (tíbias) por tratamento. Os dados obtidos foram avaliados por análise de variância. Constataram-se efeitos significativos da inclusão de óleos vegetais na dieta de poedeiras comerciais sobre as regiões epifisárias proximal, distal e diafisária das tíbias. A inclusão de óleos vegetais na dieta de poedeiras leva à redução da retenção de minerais nos ossos, entretanto essa redução pode ser amenizada, quando a suplementação é realizada com inclusões mais altas de óleos ricos em ω -3. A inclusão de ácidos graxos poliinsaturados ω -3 e ω -6 na dieta de poedeiras não influencia a formação e nem a reabsorção de tecido ósseo.

Palavras-chave: ácidos graxos poliinsaturados, densidade mineral óssea, histologia óssea, nutrição de poedeiras, resistência óssea.

¹ Projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo /FAPESP

² Pós-Doutoranda em Tecnologia dos Produtos de Origem Animal, Unesp, Botucatu.

* Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, FCA, UNESP, Botucatu, SP, Brasil, 18618-970. (16) 97224061. E-mail: abiazinha2003@yahoo.com.br. Autor para correspondência

³ Prof. Titular do Departamento de Produção Animal, FMVZ/Unesp, Botucatu

⁴ Prof. Adjunto do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV/Unesp, Jaboticabal

⁵ Doutoranda em Nutrição de Monogástricos, FCAV/Unesp, Jaboticabal

⁶ Prof. Adj. do Departamento de Morfologia, IB/Unesp, Botucatu

⁷ Prof. Adj. do Departamento de Produção Animal, FMVZ/Unesp, Botucatu

⁸ Docente do Departamento de Zootecnia da UNIFENAS – Alfenas/MG

BONE QUALITY OF LAYING HENS FED DIETS SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT VEGETABLE OILS

ABSTRACT

The present experiment was conducted on 112 days of duration with the aim of studying the effect of adding vegetable oil sources of omega 3 and omega 6 in the diet on bone quality of white layers. A total of 50 white layers, Lohmann LSL, underwent to 10 treatments (T1 - control, T2- inclusion of 2.5% of linseed oil in the diet, T3- inclusion of 2.5% of canola oil in the diet; T4-inclusion of 2.5% of soybean oil in the diet; T5-inclusion of 5% of linseed oil in the diet; T6- inclusion of 5% of canola oil in the diet; T7-inclusion of 5% oil soy in the diet; T8-inclusion of 2.5% of linseed oil +2.5% soybean oil in the diet; T9- inclusion of 2.5% canola oil + 2.5% soybean oil in the diet and T10- inclusion of 2.5% of linseed oil + 2.5% of canola oil in the diet). The characteristics assessed were: resistance to breakage and bone mineral density. Through histological analysis of tibia, there was counting of osteoclasts were measured and the thickness of compact bone and the area occupied by cancellous bone. It was used a completely randomized design with 10 treatments (different lipid inclusions) and five replicates of tibia per treatment. The data were evaluated by analysis of variance. Were found significant effects of the inclusion of vegetable oils in the diet of laying hens on the epiphyseal regions proximal and distal shaft of the tibia. The inclusion of vegetable oils in the diet of laying hens leads to reduced bone mineral retention, however this reduction can be mitigated when supplementation is performed with highest inclusions of oils rich in ω -3. The inclusion of polyunsaturated fatty acids ω -3 and ω -6 in the diet of laying hens did not influence the formation and resorption of bone tissue.

Keywords: polyunsaturated fatty acids, bone mineral density, bone histology, nutrition hens, bone strength.

CALIDAD ÓSEA DE PONEDORAS COMERCIALES ALIMENTADAS CON PIENSOS ADICIONADOS CON DIFERENTES ACEITES VEGETALES

RESUMEN

Este experimento, con 112 días de duración, fue realizado con el objetivo de estudiar el efecto de la adición de aceites vegetales, fuentes de ácidos grasos omega 3 y omega 6 en el pienso, sobre la calidad ósea de ponedoras comerciales livianas. Fueron utilizadas 50 ponedoras comerciales blancas de linaje Lohmann LSL, sometidas a 10 tratamientos experimentales (T1 – Control; T2 – inclusión de 2,5% de aceite de linaza en el pienso; T3 – inclusión de 2,5% de aceite de canola en el pienso; T4 – inclusión de 2,5% de aceite de soya en el pienso; T5 – inclusión de 5% de aceite de linaza en el pienso; T6 – inclusión de 5% de aceite de canola en el pienso; T7- inclusión de 5% de aceite de soya en el pienso; T8 – inclusión de 2,5% de aceite de linaza +2,5% de aceite de soya en el pienso; T9 – inclusión de 2,5% de aceite de canola + 2,5% de aceite de soya en el pienso y T10 – inclusión de 2,5% de aceite de linaza + 2,5% de aceite de canola en el pienso). Las características evaluadas fueron: resistencia ósea a ruptura y densidad mineral ósea. A través del análisis histológico de las tibias, se realizaron los conteos de osteoclastos y se midió la espesura del hueso compacto y el área ocupada por el hueso esponjoso. El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorio, con 10 tratamientos (diferentes inclusiones de lípidos), siendo 5 repeticiones (tibias) por tratamiento. Los datos obtenidos fueron evaluados a través de análisis de varianza. Se confirmaron efectos significativos sobre las epífisis proximal, distal y diáfisis de las tibias debido a la inclusión de aceites vegetales en el pienso de ponedoras comerciales. El uso de aceites vegetales en el

pienso de ponedoras trae consigo un detrimento en la retención de minerales en los huesos, sin embargo, esta disminución puede ser controlada cuando se usan cantidades elevadas de aceites ricos en ω -3. El uso de ácidos grasos poli insaturados ω -3 y ω -6 en el pienso de ponedoras no tuvo influencia en la formación y reabsorción de tejido óseo.

Palabras claves: ácidos grasos poli insaturados, densidad mineral ósea, histología ósea, nutrición de ponedoras, resistencia ósea.

INTRODUÇÃO

Sabe-se que muitos nutrientes presentes na dieta avícola influenciam diretamente o crescimento e a manutenção óssea, destacando-se, principalmente, o cálcio, fósforo e a vitamina D3. Atualmente, pesquisas têm revelado efeitos benéficos da ingestão de ácidos graxos para o metabolismo ósseo das aves (1). Os osteoblastos são as células formadoras do tecido ósseo, que se originam localmente à partir de células tronco mesenquimais (2) e, são as células responsáveis por sintetizar e secretar a matriz orgânica contendo o colágeno do tipo I, além de sintetizar também várias proteínas. Além disso, os osteoblastos ainda são responsáveis pela produção de inúmeros fatores regulatórios, como as prostaglandinas, citocinas e fatores de crescimento, que estimulam tanto a formação bem como a reabsorção óssea (3).

Os osteoclastos são as células responsáveis pela desmineralização óssea e digestão da matriz do osso. Durante o processo de crescimento ósseo, essas células são necessárias para a reabsorção da cartilagem calcificada e também para a modelação óssea (4).

O consumo excessivo de ácidos graxos poliinsaturados ômega 6 (ω 6) pode influenciar negativamente o metabolismo ósseo das aves, estimulando a reabsorção óssea em função da elevada produção endógena de prostaglandinas. Entretanto, os ácidos graxos da família ômega 3 (ω 3) podem exercer ação oposta, contribuindo para minimizar o processo de reabsorção óssea. Dessa forma, o decréscimo na proporção ômega-6/ômega-3 da dieta poderia atenuar o desenvolvimento de doenças metabólicas ósseas, pelo decréscimo no acúmulo de ácido araquidônico (família Ômega-6) responsável pela formação das prostaglandinas. Os ácidos graxos ômega-3 exercem função de proteção no esqueleto, indicada pelos níveis elevados de marcadores da deposição óssea, promovendo maior atividade dos osteoblastos (1).

Entre os óleos vegetais utilizados na alimentação animal, o de linhaça se caracteriza pela alta concentração de ácido linolênico, um ácido graxo poliinsaturado (AGPI) da série ômega 3 (5) que compete com o ácido linoléico (ômega 6) pelas enzimas hepáticas envolvidas nos processos de insaturação e alongamento da cadeia dos ácidos graxos.

Deve-se lembrar também que a rigidez do tecido ósseo é resultante da deposição de cálcio e fósforo, na forma de hidroxiapatita, durante o processo de mineralização óssea. Esses dois minerais perfazem cerca de 70% da composição óssea e os 30% restantes são compostos de matéria orgânica, principalmente colágeno (6-8).

A hidroxiapatita e o alumínio possuem densidades muito semelhantes. Desta forma, muitos autores realizaram estudos com o objetivo de relacionar o grau de mineralização óssea e a densidade do alumínio e concluíram que é possível comparar, por estudo radiológico, a quantidade de cálcio e fósforo depositados nos ossos com a quantidade de alumínio encontrada em uma escala pré-definida, pela análise de densitometria óssea em imagens radiográficas (9).

Diante do exposto, surge a proposta do presente estudo, que tem por objetivo estabelecer uma relação entre suplementação, via dieta, de poedeiras comerciais com ácidos graxos fontes de ácidos graxos ω -3 e ω -6 e qualidade óssea dessas aves, utilizando-se, para tanto, as técnicas de densitometria mineral óssea em imagens radiográficas, resistência óssea à quebra e análise histológica dos ossos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na UNESP- Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e teve duração de 112 dias. Utilizaram-se 50 tíbias de poedeiras comerciais da linhagem leve LOHMANN LSL com 51 semanas de idade.

Durante o período experimental, as aves foram mantidas sob as mesmas condições de manejo e alimentação.

Os tratamentos experimentais consistiram na alimentação das aves com rações suplementadas com óleos vegetais ricos em ácidos graxos poliinsaturados das famílias ômega 3 e ômega 6, conforme se segue: ração convencional sem adição de óleo (T1); inclusão de 2,5% de óleo de linhaça (T2); inclusão de 2,5% de óleo de canola (T3); inclusão de 2,5% de óleo de soja (T4); inclusão de 5% de óleo de linhaça (T5); inclusão de 5% de óleo de canola (T6); inclusão de 5% de óleo de soja (T7); inclusão de 2,5% de óleo de linhaça + 2,5% de óleo de soja (T8); inclusão de 2,5% de óleo de canola + 2,5% de óleo de soja (T9) e inclusão de 2,5% de óleo de linhaça + 2,5% de óleo canola (T10).

As rações experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja, diferindo entre si apenas em relação ao tipo de óleo vegetal empregado e ao seu nível de inclusão.

Após serem submetidas por 112 dias aos tratamentos experimentais, cinco aves por tratamento foram sacrificadas por meio do corte da veia jugular e da artéria carótida, após atordoamento por eletronarcose, para retirada de suas tíbias que, posteriormente, foram avaliadas por densitometria óssea e resistência à quebra para a determinação da qualidade óssea.

As tíbias direitas foram mantidas inteiras e em estado natural, sendo submetidas inicialmente à análise de densidade mineral, por meio da análise de densitometria óssea, a partir de imagens radiográficas obtidas das tíbias (10), utilizando-se o software específico Image-Pro Plus, Media Cybernetics, versão 4.1. Como referencial densitométrico para as amostras radiográficas, utilizou-se uma escada de alumínio (liga 6063, ABNT) de 12 degraus (0,5mm de espessura para o primeiro degrau), variando de 0,5 em 0,5mm até o décimo, sendo que o décimo primeiro degrau apresentava 6,0 mm de espessura e o décimo segundo 8,0mm; cada degrau possuía 5 X 25mm² de área radiografada, concomitantemente, com os ossos das aves. A escada foi posicionada paralelamente aos ossos de interesse, de forma que os degraus mais altos permaneceram no alto do chassi.

Para realização das leituras densitométricas, utilizou-se um scanner A3 scaníon para digitalização das imagens radiográficas e, posteriormente, as mesmas foram armazenadas em microcomputador. Estas imagens digitalizadas foram submetidas ao software computacional Image-Pro Plus, Media Cybernetics, versão 4.1, onde se realizou a calibração do aparelho para a densidade mineral óssea. Em seguida, foram aferidas as medidas da densidade mineral óssea do osso de interesse em suas diferentes regiões (epífise proximal, diáfise, e epífise distal). Os valores densitométricos foram expressos em milímetros de alumínio (mm Al).

Após a realização das análises de densitometria mineral óssea, as mesmas tíbias foram submetidas à análise de resistência ao rompimento. As análises de resistência óssea foram realizadas por meio de uma célula específica acoplada ao equipamento Texture Analyser TA. XT Plus, com a utilização da sonda Blade Set HDP/BS, com velocidade de pré teste de 2,0 mm/segundo, velocidade de teste de 1,0mm/segundo e velocidade de pós teste de 4,0mm/segundo. As tíbias foram acomodadas e centralizadas em suporte com vão livre de 6 cm. Somente após fixação de um vão livre para a realização das avaliações de resistência, pôde-se comparar os valores obtidos (kgf). Um software específico foi utilizado para registrar a força necessária empregada para o rompimento total dos ossos.

As tíbias esquerdas, em estado natural, foram seccionadas em sua porção mediana, no sentido transversal, de onde foram coletados fragmentos de 2,0 cm de cada osso, os quais foram utilizados para a realização das análises morfométricas. Nas lâminas histológicas, mensurou-se a área de tecido ósseo formado (compacto e esponjoso) e realizou-se a contagem de osteoclastos. Todas as análises foram efetuadas em 5 campos distintos, previamente delimitados em cada lâmina. As lâminas histológicas foram analisadas com o auxílio de microscópio ótico com aumento de 40x, acoplado ao sistema analisador de imagens Leica Qwin.

O delineamento experimental utilizado para a densitometria e resistência óssea foi o inteiramente ao acaso, com 10 tratamentos (diferentes inclusões lipídicas) e 5 repetições por tratamento experimental.

Para as análises histológicas utilizou-se um delineamento experimental inteiramente ao acaso em parcelas subdividas no espaço com 4 tratamentos, 5 repetições por tratamento e 5 campos por repetição.

Os valores obtidos foram avaliados pela análise de variância de acordo com o pacote computacional SAS (11). A comparação entre as médias foi efetuada pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, estão apresentados os dados referentes à composição em ácidos graxos dos óleos vegetais que compuseram as dietas experimentais.

Tabela 1. Composição analisada em ácidos graxos dos óleos vegetais empregados nas dietas experimentais (% do total de ácidos graxos).

| Ácidos Graxos | Óleo de Canola | Óleo de Linhaça | Óleo de Soja |
|--------------------------------------|----------------|-----------------|--------------|
| | % | | |
| C16:0 – Ác. Palmítico | 12,3751 | 6,3720 | 13,0608 |
| C18:0 – Ác. Esteárico | 2,4502 | 3,9842 | 2,2366 |
| C18:1 – Ác. Oleico | 45,2735 | 24,8235 | 23,0449 |
| C18:2 – Ác. Linoleico (ω 6) | 36,5747 | 14,6624 | 56,4484 |
| C18:3 – Ac. Linolênico (ω 3) | 3,3264 | 50,1580 | 5,2094 |

Os dados referentes à resistência à quebra e densitometria mineral óssea das tíbias de poedeiras comerciais submetidas aos tratamentos experimentais encontram-se descritos na Tabela 2.

Considerando-se a resistência dos ossos à quebra, os resultados obtidos demonstraram não haver efeito significativo da inclusão de óleos vegetais na dieta de poedeiras sobre tal característica.

As ações positivas dos ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (ácido graxo eicosapentaenóico – EPA) sobre os ossos podem ser atribuídas à sua ação de aumentar a absorção de cálcio no intestino e melhorar a formação óssea pelo aumento na deposição de cálcio e pela redução na reabsorção óssea por meio da menor excreção urinária de cálcio (12, 13); entretanto, no presente estudo, não se observou efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados, na dieta, sobre a resistência óssea das poedeiras.

Analisando-se os dados de densidade mineral óssea, foram constatados efeitos significativos da inclusão de óleos vegetais na dieta de poedeiras comerciais sobre as regiões epifisárias proximal e distal e diafisária das tíbias.

Tabela 2. Resistência à quebra (Resist. óssea), densidade mineral óssea da epífise distal (ED), da diáfise (DF) e da epífise proximal (EP) das tíbias de poedeiras comerciais alimentadas com rações suplementadas com óleos vegetais fontes de ácidos graxos ômega 3 e ômega 6.

| Tratamentos | Resist. Óssea (kgf) | ED (mm de Al) | DF (mm de Al) | EP (mm de Al) |
|---------------------------|------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Controle (sem óleo) | 9,13 | 4,09ab | 6,24a | 6,63a |
| 2,5% linhaça | 9,14 | 4,65 ^a | 5,31b | 5,30bc |
| 2,5 canola | 8,56 | 2,82c | 4,74cd | 5,26bcd |
| 2,5% soja | 9,30 | 3,86ab | 5,36b | 5,63b |
| 5% linhaça | 8,84 | 4,36ab | 5,29b | 6,00ab |
| 5% canola | 9,80 | 3,72abc | 4,66d | 4,55cd |
| 5% soja | 9,35 | 3,46bc | 4,70d | 5,20bcd |
| 2,5% linhaça +2,5% soja | 9,56 | 3,43bc | 4,55d | 4,57cd |
| 2,5% canola +2,5% soja | 9,41 | 4,40ab | 5,25bc | 5,22bcd |
| 2,5% linhaça +2,5% canola | 10,02 | 3,96ab | 4,38d | 4,40d |
| Probabilidade | P>0,05 | P<0,001 | P<0,001 | P<0,001 |
| CV(%) | 18,39 | 12,04 | 4,95 | 7,78 |

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem, significativamente, pelo Teste Tukey (P<0,05).

Observou-se que tíbias provenientes das poedeiras alimentadas com rações sem suplementação de óleo (controle) apresentaram valores de densidade mineral da epífise distal semelhantes aos valores obtidos para os demais tratamentos, diferindo, apenas, dos valores encontrados para as tíbias das aves suplementadas com 2,5% de óleo de canola.

Para a região diafisária das tíbias, o tratamento controle (sem óleo) promoveu maior retenção de minerais, fato que pôde ser comprovado pelo maior valor de densidade mineral encontrado para essa região do osso.

Constatou-se que, para a região epifisária proximal das tíbias, o tratamento em que as aves não foram suplementadas com óleo também promoveu maior retenção de minerais. Tal resultado foi, estatisticamente, semelhante ao encontrado para as tíbias das poedeiras suplementadas com 5% de óleo de linhaça na ração.

Vários fatores interferem na absorção de minerais pelas aves, tais como: composição do alimento, tipo de processamento da matéria prima, idade e espécie do animal, entre outros (14).

Alguns autores (15-17) relataram que a adição de gorduras à ração de frangos de corte interfere no metabolismo mineral, reduzindo a retenção e absorção intestinal do cálcio e os teores de cinzas e do cálcio nos ossos. Isso é atribuído à formação de sabões insolúveis de ácidos graxos com o cálcio e fósforo no intestino delgado das aves, o que diminui a absorção intestinal e a retenção do cálcio (15-17, 18-20).

Segundo estudo realizado em frangos de corte, constatou-se maior retenção de cálcio e fósforo nos ossos dos frangos alimentados com dietas sem adição de óleo, independentemente do nível de cálcio presente na ração. Segundo os mesmos autores, a deposição de fósforo nos ossos acompanha a deposição de cálcio, o que caracteriza a interdependência entre esses minerais, formando sais insolúveis que interferem na absorção de ambos pela ave (21).

Dietas com baixa proporção ω -6: ω -3 exercem efeitos benéficos sobre os ossos, entre estes, podem-se destacar: aumento na absorção do cálcio intestinal e redução no “turnover”

ósseo, maior deposição de cálcio nos ossos, incremento ao transporte do cálcio no duodeno, elevada síntese do colágeno ósseo e decréscimo na produção da prostaglandina atuante no osso (1). Além disso, segundo o mesmo autor, ácidos graxos ω 3 exercem função de proteção do esqueleto, aumentando a atividade das células formadoras ou osteoblastos. Os resultados obtidos pela presente pesquisa concordaram com os relatos do autor supra citado e apontaram que os ossos provenientes dos tratamentos em que foram empregadas altas concentrações de ácidos graxos ω -3, na dieta, apresentaram valores elevados de densidade mineral, demonstrando-se semelhantes aos valores obtidos para as tíbias das aves provenientes do tratamento em que não houve suplementação de óleo na dieta; sendo, assim, o efeito negativo da alta inclusão de lipídeos, na dieta, sobre o metabolismo do cálcio pode ter sido contornado pelos efeitos positivos da alta ingestão de ω -3 pelas aves.

Na Tabela 3 encontram-se descritos os dados referentes às médias obtidas para o número de osteoclastos, espessura de osso compacto e área de osso esponjoso nas tíbias de poedeiras comerciais submetidas aos tratamentos experimentais.

Não foram observadas diferenças estatísticas ($P>0,05$) entre os tratamentos para espessura de osso compacto e nem para área ocupada por osso esponjoso nas tíbias, o que indica pouca atividade de osteoblastos, ou seja, a suplementação com ácidos graxos ω -3 ou ω -6 não influenciou a produção e nem atividade dos osteoblastos, não afetando dessa forma, a formação óssea.

Tabela 3. Número de osteoclastos, espessura de osso compacto e área de osso esponjoso das tíbias de poedeiras comerciais alimentadas com rações suplementadas com óleos vegetais fontes de ácidos graxos ômega 3 e ômega 6.

| Tratamentos | Número de Osteoclastos | Espessura Osso Compacto (μm) | Área de Osso Esponjoso (μm^2) |
|---------------------|------------------------|---|--|
| Controle (sem óleo) | 13,1600 | 565,1064 | 18935,93 |
| 5% linhaça | 15,8000 | 509,7696 | 17815,60 |
| 5% canola | 16,2800 | 464,5340 | 18220,43 |
| 5% soja | 17,0800 | 482,6180 | 18261,46 |
| Probabilidade | $P>0,05$ | $P>0,05$ | $P>0,05$ |
| CV(%) | 20,50 | 22,77 | 22,41 |

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem, significativamente, pelo Teste Tukey ($P<0,05$).

Os resultados obtidos no presente estudo, discordam daquele em que observou-se que o consumo excessivo de ácidos graxos poliinsaturados ω -6, pode influenciar negativamente o metabolismo ósseo das aves, estimulando a reabsorção óssea. Segundo o mesmo autor, os ácidos graxos da família ω -3 contribuem para minimizar o processo de reabsorção óssea, exercendo função de proteção no esqueleto, promovendo maior atividade dos osteoblastos (1).

As Figuras 1 e 2 ilustram cortes transversais da tíbia de poedeiras comerciais, indicados pelas setas, observa-se as células responsáveis pela reabsorção óssea, os osteoclastos e regiões formadas por osso esponjoso, osso compacto e matriz óssea.

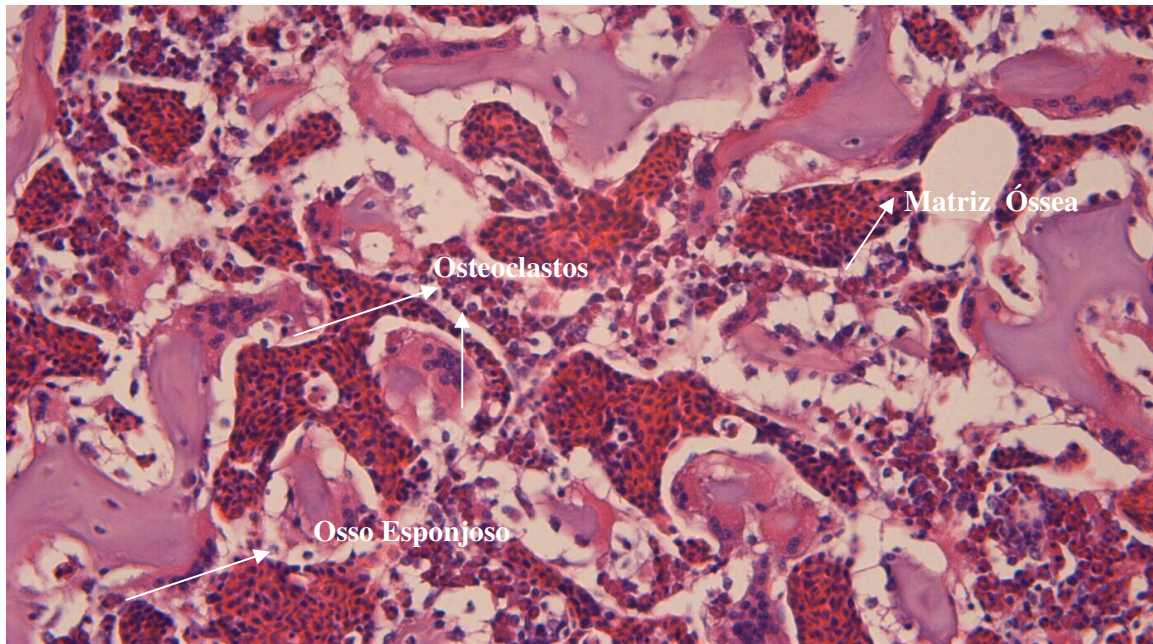


Figura 1. Corte transversal da tíbia de poedeiras comerciais: osso esponjoso, osteoclastos e matriz óssea encontram-se indicados pelas setas. Hematoxilina e Eosina. Obj. 40X.

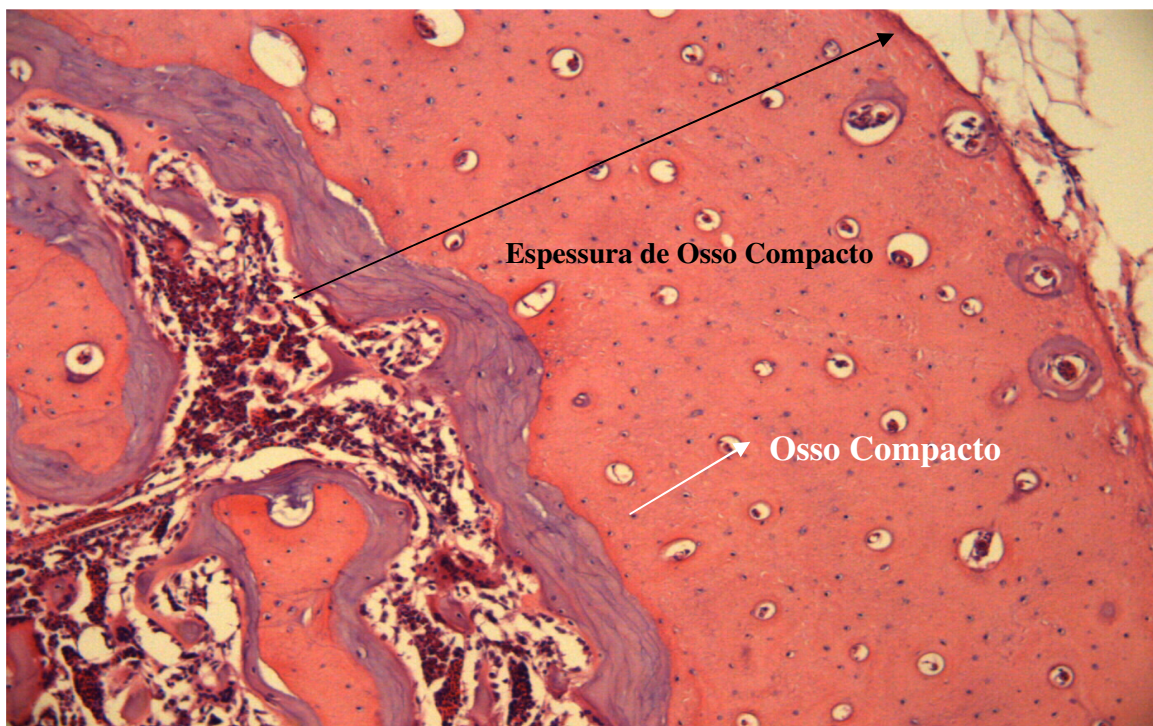


Figura 2. Corte transversal da tíbia de poedeiras comerciais, a seta indica a região formada por osso compacto. Coloração Hematoxilina e Eosina. Obj. 40X.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos com a presente pesquisa, conclui-se que a suplementação da dieta com óleos vegetais ricos em ácidos graxos poliinsaturados ω -3 e ω -6 não altera a resistência óssea de poedeiras comerciais e nem influencia na formação/remodelação dos ossos.

A inclusão de óleos vegetais, na dieta de poedeiras, leva à redução na retenção de minerais nas regiões diafisária e epifisária proximal das tíbias.

REFERÊNCIAS

1. Mazzuco H. Integridade óssea em poedeiras comerciais: influência de dietas enriquecidas com ácidos graxos poliinsaturados e tipo de muda induzida. (Circular técnica 47). Concórdia: EMBRAPA, CNPSA; 2006 [acesso em 2006 jul 10]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2005/SalmonellaAnnualSummary2005.pdf>.
2. Bernardino MP. Influência dos lipídeos da dieta sobre o desenvolvimento ósseo de frangos de corte. *Rev Eletrônica Nutritime*. 2009;6(3):960-6.
3. Liu D. The effects of dietary lipids on bone chemical, mechanical, and histological properties in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) [tese]. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University; 2000.
4. Gay CV, Gilman VR, Sugiyama T. Perspectives on osteoblast and osteoclast function. *Poult Sci*. 2000;79(7):1005-8.
5. Kratzer FH, Vohra P. The use of flaxseed as a poultry feedstuff [cited 2009 Dec 1]. Available from: <http://animalscience.ucdavis.edu/avian/pfs21.htm>.
6. Kålebo P, Strid KG. Bone mass determination from microradiographs by computer-assisted videodensitometry. *Acta Radiol*. 1988;29(5):465-72.
7. Field RA. Ash and calcium as measures of bone in meat and bone moistures. *Meat Sci*. 1999;55(3):255-64.
8. Bruno LDG. Desenvolvimento ósseo em frangos: influência da restrição alimentar e da temperatura ambiente [tese]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2002.
9. Almeida Paz ICL. Avaliação da densidade mineral óssea em matrizes pesadas por meio da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas [tese]. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista; 2006.
10. Louzada MJQ. Otimização da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas de peças ósseas. Estudo in vitro [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1994.
11. SAS Institute. Getting started with the SAS learning edition. Care (NC); 2002.
12. Claassen N, Coetzer H, Steinmann CM, Kruger MC. The effect of different n-6/n-3 essential fatty acid ratios on calcium balance and bone in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1995;53(1):13-9.
13. Krueger MC, Horrobin DF. Calcium metabolism, osteoporosis and essential fatty acids: a review. *Prog Lipid Res*. 1997;36(2-3):131-51.

14. Ensminger ME, Oldfield JE, Heinemann WW. Feeding poultry: feeds and nutrition. 2nd ed. California: Ensminger; 1990.
15. Griffith FD, Grainger RB, Begin JJ. The effect of dietary fat and cellulose on apparent calcium digestibility in growing chickens. *Poult Sci.* 1961;40(6):1492-7.
16. Waibel PE, Mraz FR. Calcium, stroncium and phosphorus utilization by chiks as influenced by nutrition and endocrine variations. *J Nutr.* 1964; 84(1):58-64.
17. Whitehead CC, Dewar WA, Downie JN. Effect of dietary fat on mineral retention in the chick. *Br Poult Sci.* 1971;12(2):249-54.
18. Atteh JO, Lesson S. Effects of dietary fatty acids and calcium levels on performance and mineral metabolism of broiler chickens. *Poult Sci.* 1983;62(12):2412-9.
19. Atteh JO, Lesson S. Effects of dietary levels and types of fat on performance and mineral metabolism of broiler chicks. *Poult Sci.* 1983;62(12):2403-11.
20. Atteh JO, Lesson S. Effects of dietary saturated or unsaturated fatty acids and calcium levels on performance and mineral metabolism of broiler chicks. *Poult Sci.* 1984;63(11):2252-60.
21. Dell'Isola ATP, Veloso JAF, Baião NC, Medeiros SL. Efeito do óleo de soja em dietas com diferentes níveis de cálcio sobre a absorção e retenção óssea de cálcio e de fósforo em frangos de corte. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2003;55(4):461-6.

Recebido em: 03/02/11

Aceito em: 22/05/12

AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE CORTISOL E PROGESTERONA EM VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*) SUBMETIDAS A MANEJO DIÁRIO OU MANEJO SEMANAL

Rosiára Rosária Dias Maziero¹
Ian Martin²
Maria Clara Costa Mattos³
João Carlos Pinheiro Ferreira⁴

RESUMO

Este estudo avaliou os níveis séricos de cortisol e progesterona de fêmeas bovinas submetidas a manejo diário e semanal. Foram utilizadas 07 vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) primíparas e multíparas, em dois experimentos. No experimento 1, os animais foram manejados diariamente, acompanhados durante 21 dias consecutivos, tempo equivalente a um ciclo estral. Já no experimento 2, os animais foram acompanhados por 09 semanas consecutivas. Todos os animais foram conduzidos ao tronco de contenção, submetidos a palpação transretal e ultrassonografia do aparelho genital feminino, assim como venopunção jugular. As amostras de plasma foram congeladas e, posteriormente, utilizadas para a dosagem das concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona pela técnica de radioimunoensaio. As concentrações plasmáticas de progesterona dos animais do experimento 1 variaram entre 0,13 a 4,42 ng/mL ($p < 0,05$), enquanto que os do experimento 2 não variaram entre as semanas (0,17 a 1,2 ng/mL; $p > 0,05$). A dosagem de cortisol apresentou valores médios entre 10 a 50 ng/mL nos animais do experimento 1, e 8,3 a 62 ng/mL nos do experimento 2. Houve correlação positiva entre o cortisol e a progesterona nos animais do experimento 2 ($r = 0,909$; $p < 0,05$), mas não nos do experimento 1 ($r = 0,03$; $p > 0,05$). Os procedimentos de manejo utilizados tanto no experimento 1 como no 2 foram capazes de induzir estresse nos animais.

Palavras-chave: vaca, manejo, estresse, cortisol, progesterona

PLASMA CONCENTRATION OF PROGESTERONE AND CORTISOL IN NELORE COWS (*Bos taurus indicus*) SUBMITTED TO DAILY OR WEEKLY HANDLING

ABSTRACT

This study evaluates the plasma concentration of progesterone and cortisol in cows submitted to daily or weekly handling. For this experiment, seven primiparous or multiparous Nelore cows (*Bos taurus indicus*) were monitored for 21 days (experiment 1) and 9 weeks (experiment 2) through rectal palpation and ultrasonographic examination of the female reproductive tract, as well as jugular venipuncture. Plasma concentration of progesterone and cortisol (ng/mL) was determined by radioimmunoassay from blood samples collected from jugular vein on the differently handling experiments. For experiment 1, the plasma concentration of progesterone ranged from 0.13 to 4.42 ng/mL, however, there were no

¹ Doutoranda - Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Botucatu – SP. Tel/Fax: (14) 38116249. E-mail: rosiaramaziero@yahoo.com.br, autor para correspondência.

² Pós-Doutorando - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Campus de Botucatu. E-mail: ianmartin@uol.com.br

³ Médica Veterinária autônoma E-mail: mmary_ccm@yahoo.com.br

⁴ Prof. Ass. Dr. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Campus de Botucatu. E-mail: jcpferreira@fmvz.unesp.br

differences in experiment 2 (0.17 to 1.2 ng/mL; $p > 0.05$). Plasma concentration of cortisol showed values between 10-50 ng/mL in experiment 1 and 8.3 to 62 ng/mL in the experiment 2. There were correlations between cortisol and progesterone in the experiment 2 ($r = 0.909$; $p < 0.05$) but not in the experiment 1 ($r = 0.03$; $p > 0.05$). The handling procedures used in experiments were able to induce stress in the treated animals.

Keywords: cow, handling, stress, cortisol, progesterone.

EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CORTISOL Y PROGESTERONA EN VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*) SOMETIDAS A CONDICIONES DE MANEJO DIARIO O SEMANAL

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los niveles séricos de cortisol y progesterona en hembras bovinas sometidas a condiciones de manejo diario o semanal. Fueron utilizadas siete vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) primíparas y múltíparas, en dos experimentos. En el experimento 1, los animales fueron sometidos a condiciones de manejo diario y acompañados durante 21 días consecutivos, tiempo equivalente a un ciclo estral. En el experimento 2, fueron acompañados por nueve semanas consecutivas. Todos los animales fueron conducidos a la manga de manejo, sometidos a palpación transrectal y ultrasonografía del aparato genital femenino, así como a extracción de sangre por medio de punción yugular. Las muestras de plasma fueron congeladas y posteriormente procesadas para medir la concentración de cortisol y progesterona por la técnica de radioinmunoensayo. Las concentraciones plasmáticas de progesterona de los animales del experimento 1, variaron de 0,13 a 4,42 ng/mL ($p < 0,05$), mientras que las del experimento 2 no variaron (0,17 a 1,2 ng/mL; $p > 0,05$). La concentración de cortisol presentó valores entre 10 y 50 ng/mL en los animales del experimento 1, y de 8,3 a 62 ng/mL en los del experimento 2. Hubo correlación positiva entre el cortisol y la progesterona en los animales del experimento 2 ($r = 0,909$; $p < 0,05$), pero no en los animales del experimento 1 ($r = 0,03$; $p > 0,05$). Los procedimientos de manejo utilizados tanto en el experimento 1 como en el experimento 2, demostraron inducir estrés en los animales.

Palabras clave: vacas, manejo, estrés, cortisol, progesterona

INTRODUÇÃO

O estresse é definido como a ruptura da homeostase dos organismos vivos em que existe uma resposta comportamental ou fisiológica contra estímulo nocivo ou condição adversa do ambiente. Esta alteração pode interferir no bem-estar ou na atividade reprodutiva do animal, assim como em alterações cardiovasculares, endócrinas e metabólicas (1, 2).

A resposta gerada pelo organismo sob estresse envolve a secreção de glicocorticóides e progesterona pelas glândulas adrenais (3-5). Esta resposta é desencadeada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), com o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH), secretado pelo hipotálamo e consequente liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela adenohipófise (6, 7).

A secreção de hormônios pela glândula adrenal em resposta ao estresse, controlada pelo CRH, afeta diretamente a reprodução por inibir a liberação de hormônios gonadotróficos pela adenohipófise. Alguns estudos mostraram que os efeitos negativos provocados pelo estresse podem inibir o pico pré-ovulatório de LH ou inibir a ovulação e até mesmo piorar a qualidade dos embriões produzidos (2-4, 8, 9). Outros constataram que a administração exógena de

ACTH resultou em efeitos similares aos da ocorrência de estresse agudo, com o aumento dos níveis séricos de cortisol e progesterona (3, 4, 8, 10).

Outros autores relataram que a administração de ACTH foi capaz de inibir o estro em vacas devido à diminuição na secreção de estrógenos. Com isso, o pico de LH foi retardado e a ovulação ocorreu mais tardiamente (11, 12). Esta baixa concentração de estradiol acarretou também uma diminuição na intensidade e ocorrência de estro (13).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar se as práticas rotineiras de manejo são capazes de alterar as concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*), e se existem diferentes respostas destes hormônios indicadores de estresse em animais manejados diariamente ou semanalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 07 vacas Nelore, PO, adultas, com idades entre 3 e 14 anos ($6,6 \pm 0,81$) e escore corporal igual ou superior a 3 (escala de 0 a 5) (14), provenientes do rebanho da Fazenda Experimental São Manuel - FMVZ – UNESP (São Manuel - SP). Todas as fêmeas foram mantidas em regime de estabulação parcial recebendo feno de alfafa, farelo de milho, sal mineral proteinado e água *ad libitum*.

Experimento 1

Os animais (n= 3) foram submetidos a sincronização do estro com uma aplicação de 25 µg lecorelina (Gestran Plus®, IM) e, sete dias mais tarde de, 0,15 mg de D-Cloprostenol (Preloban®, IM) (15). Após a última administração os animais foram avaliados diariamente por palpação retal e ultrassonografia transretal (ALOKA SSD 500 com transdutor de 5,0 MHz) até comprovada a ovulação. Foram realizadas colheitas diárias de sangue por venopunção jugular. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 2500 x g por 15 minutos e o plasma obtido foi acondicionado em tubos plásticos e armazenados em freezer a -20°C.

Experimento 2

Os animais (n=4) apresentavam-se em anestro puerperal, com intervalo superior a 30 dias pós-parto. Os animais foram avaliados semanalmente por palpação retal e ultrassonografia transretal (ALOKA SSD 500 com transdutor de 5,0 MHz) do aparelho genital feminino. Foram realizadas colheitas semanais de sangue por venopunção jugular. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 2500 x g por 15 minutos e o plasma obtido foi acondicionado em tubos plásticos e armazenados em freezer a -20°C.

Dosagens hormonais

As dosagens plasmáticas de cortisol e progesterona foram realizadas em duplicatas utilizando-se kits comerciais em fase sólida (Coat A – Count DPC), com leitura por sistema de radioimunoensaio. O processamento das amostras foi realizado em dois ensaios, sendo o coeficiente de variação inter-ensaio de 10,4% para progesterona e 9,5% para cortisol e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 8,3% para progesterona e 6,8% para cortisol.

Análise Estatística

Para todas as variáveis foram determinadas a média e o erro padrão. A comparação entre dias e semanas dentro do grupo foi realizada empregando-se ANOVA e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste *Tukey*. Para a comparação das médias de cortisol entre

o grupo manejo diário e o manejo semanal foi utilizado o teste *t de Student*. Para a correlação entre os valores plasmáticos de cortisol e progesterona foi realizado o teste de *Pearson*. Os valores foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1

Na Figura 1 estão representadas as concentrações plasmáticas média e o erro padrão de cortisol e progesterona (ng/mL). Ao longo do estudo, não foram detectadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) para os valores plasmáticos de cortisol e estes oscilaram entre 10-50 ng/mL. Entretanto, os valores médios de progesterona modificaram-se ao longo dos dias ($p < 0,05$) e apresentaram valores entre 0,13- 4,42 ng/mL. Não houve correlação entre as concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona ao longo dos dias ($r = 0$; $p > 0,05$).

O primeiro aumento detectado nos níveis plasmáticos de progesterona do grupo manejo diário ocorreu no quinto dia, seguido de um novo aumento no dia sete, e a concentração máxima de progesterona foi observada no dia 10. A primeira queda de progesterona foi observada no dia 13, seguida de uma nova queda no dia 19, alcançando níveis inferiores a 1 ng/mL. Este perfil hormonal observado é semelhante ao descrito por diversos autores para a espécie bovina (16-20).

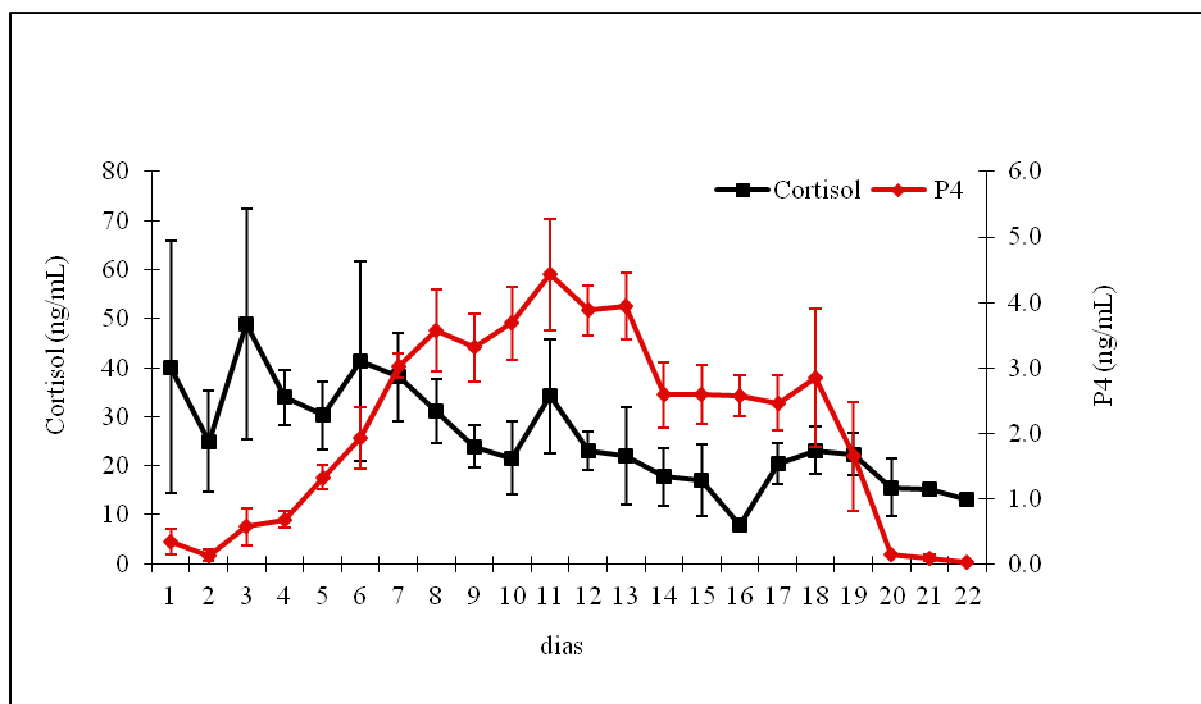


Figura 1. Concentrações plasmáticas média e erro padrão de cortisol (ng/mL) e progesterona (P4) (ng/mL) do experimento 1.

Experimento 2

Na Figura 2 estão demonstradas as concentrações plasmáticas média e o erro padrão de cortisol e progesterona. Para estas duas variáveis não foram detectadas diferenças ao longo do estudo ($p > 0,05$). Os níveis plasmáticos de cortisol oscilaram entre 8,3-62 ng/mL e os níveis de progesterona entre 0,17 – 1,2 ng/mL. Entretanto, ao ser realizado o teste de correlação entre os dois hormônios avaliados observou-se uma correlação positiva entre o cortisol e a progesterona durante as semanas de estudo ($r = 0,9$; $p < 0,05$).

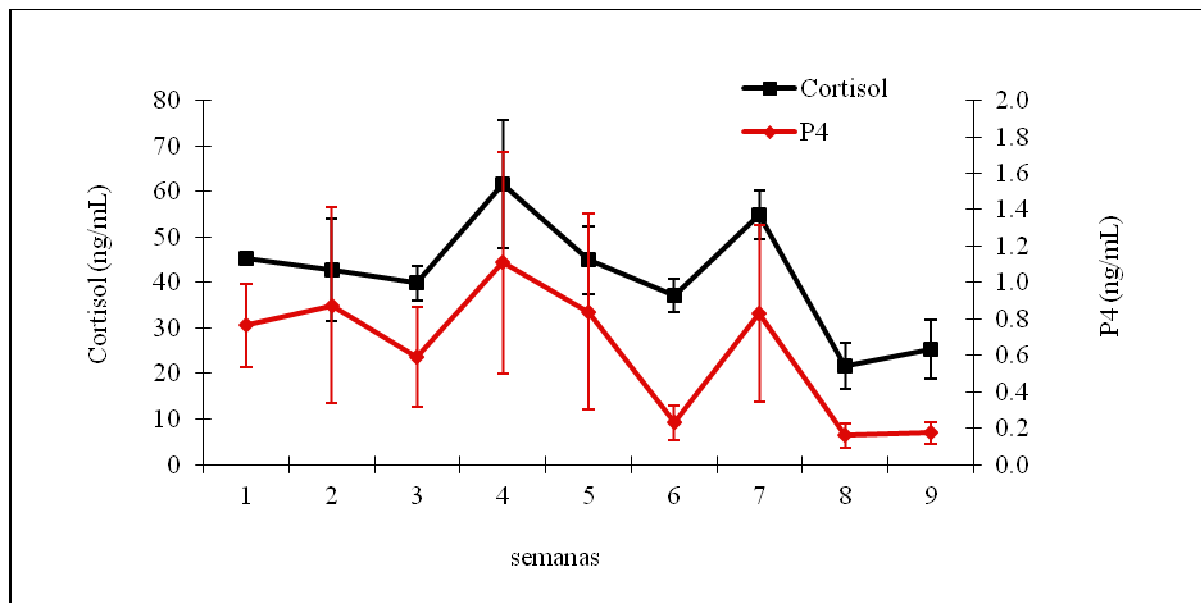


Figura 2. Concentrações plasmáticas média e erro padrão de cortisol (ng/mL) e progesterona (P4) (ng/mL) do experimento 2 - linha tracejada representa os valores basais de cortisol (ng/mL).

DISCUSSÃO

Os níveis séricos de cortisol tanto no experimento 1 como no experimento 2 apresentaram-se iguais ou superiores a 10 ng/mL, sendo que o valor basal determinado em bovinos varia entre 5 e 10 ng/mL (10). Esses valores elevados de cortisol sugerem que procedimentos rotineiros, como manejo dos animais em tronco, colheita de sangue e palpação transretal são suficientes para desencadear estresse nos animais, levando-se em conta que o cortisol é o principal hormônio indicador de estresse (2, 21). Estes valores são superiores aos encontrados por Hein e Allrich (8) em animais submetidos à colheita de sangue e administração de veículo aquoso intravenoso, no qual o valor sérico médio de cortisol foi de 12,4 ng/mL. Outros autores relatam que os níveis basais de cortisol encontrados foram de 3,8 e 4,4 ng/mL para animais submetidos também apenas à colheita de sangue (10). Deve-se considerar, entretanto, que diferenças nos resultados de dosagens hormonais entre estudos podem ser devido a diferenças nas técnicas laboratoriais adotadas e não na fisiologia animal.

Outros estudos mostram que demais procedimentos como injeção intramuscular em vacas taurinas elevam as concentrações de cortisol acima de 10 ng/mL (10). A partir desses resultados pode-se sugerir que os animais zebuínos, como os do presente estudo, são mais sensíveis e apresentam concentrações plasmáticas de cortisol superiores aos encontrados em animais de raças européias, quando submetidos a procedimentos rotineiros como vacinações e palpações retais. Contudo, o significado dessa maior elevação ainda requer novos estudos que relacionem os valores encontrados com outros indicadores de estresse/bem-estar, como os indicadores comportamentais.

Ao correlacionar as concentrações plasmáticas de cortisol entre os experimentos, observou-se que no experimento 2 (manejo semanal), os animais apresentaram concentrações médias superiores as observadas nos animais do experimento 1 (manejo diário) 41,53 *versus* 25,73 ng/mL ($p < 0,005$). Isto pode sugerir que os animais se acostumam ao manejo diário e apresentam níveis decrescentes desse hormônio, enquanto que os animais do manejo semanal não se adaptaram ao tipo de manejo e assim, os níveis plasmáticos mantiveram-se superiores por todo o estudo.

As concentrações plasmáticas médias de progesterona observadas nos animais do experimento 2 (manejo semanal), composto por vacas em anestro puerperal lactacional, foram superiores aos obtidos no experimento 1 (manejo diário) após a luteólise ($< 0,14$ ng/mL) e mantiveram-se sempre acima de $0,59$ ng/mL, exceto em três momentos (M6, M8 e M9). Valores relativamente elevados desse hormônio no experimento 2 (manejo semanal) sugerem a existência de uma fonte de progesterona extra-ovariana, as glândulas adrenais, mesmo porque não foram detectados sinais de ovulação nestes animais, utilizando-se a palpação retal e a ultrassonografia do aparelho genital feminino.

Nestes estudos os níveis de progesterona e cortisol apresentaram correlação positiva ($r = 0,9$; $p < 0,05$). Outros autores, também relataram que o aumento de cortisol foi acompanhado pelo aumento nos níveis séricos de progesterona (3, 10, 22, 23). Isto demonstra que as glândulas adrenais respondem ao estresse produzindo simultaneamente esses dois hormônios indicadores de estresse.

CONCLUSÕES

Os resultados destes estudos indicam que os dois tipos de manejo utilizados foram capazes de induzir o estresse, com uma maior resposta nos animais do experimento 2 (manejo semanal). Adicionalmente pôde ser observado que os animais em anestro (experimento 2) apresentam uma correlação positiva entre o aumento de cortisol e de progesterona em situações de estresse.

REFERÊNCIAS

1. Broom DM, Goode JA, Hall SJG, Lloyd DM, Parrot RF. Hormonal and physiological effects of a 15 hours road journey in sheep: comparison with the responses to loading, handling and penning in the absence of transport. *Br Vet J.* 1996;152:593-604.
2. Macedo GG, Zúccari CESN, Pinto de Abreu UG, Negrão JA, Costa e Silva EV. Human-animal interaction, stress, and embryo production in *Bos indicus* embryo donors under tropical conditions. *Trop Anim Health Prod.* 2011;43:1175-82.
3. Bage R, Forsberg M, Gustafsson H, Larsson B. Effects of ACTH-challenge on progesterone and cortisol levels in ovariectomised repeat breeder heifers. *Anim Reprod Sci.* 2000;63:65-76.
4. Hollenstein K, Janett F, Bleul U, Hassig M, Kahn W, Thun R. Influence of estradiol on adrenal activity in ovariectomized cows during acute stress. *Anim Reprod Sci.* 2005;11:1-1.
5. Sapolsky RM, Romero ML, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrinology.* 2000;89:21-55.
6. Rivier C, Rivest S. Effects of stress on the activity of hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod.* 1991;45:523-32.
7. Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med.* 1998;129:229-40.
8. Hein KG, Allrich RD. Influence of exogenous adrenocorticotrophic hormone on estrous behavior in cattle. *J Anim Sci.* 1992;70:243-7.

9. Dobson H, Smith RF. What is stress, and how does it affect reproduction. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:743-52.
10. Yoshida C, Nakao T. Response of plasma cortisol and progesterone after ACTH challenge in ovariectomized lactating dairy cows. *J Reprod Dev.* 2005;51:99-107.
11. Davidge ST, Wiebold JL, Sewer PL, Hillers JK. Influence of varying levels of blood progesterone upon estrous behavior in cattle. *J Anim Sci.* 1987;64:126-32.
12. Roelofs J, López-Gatius F, Hunter RHF, Van Eedenburg FJCM, Hanzen CH. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology.* 2010;74:327-44.
13. Dobson H, Tebble JE, Smith RF, Ward WR. Is stress really all that important? *Theriogenology.* 2001;55:65-73.
14. Wildman EE, Jones GM, Wagner PE, Boman RL, Troutt Jr HF, Lesch TN. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J Dairy Sci.* 1982;65:495-501.
15. Barros CM, Moreira MB, Figueiredo RA, Teixeira AB, Trinca LA. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF₂alpha and estradiol benzoate. *Theriogenology.* 2000;15:1121-34.
16. Dobson H, Midmer SE, Fitzpatrick RJ. Relationship between progesterone concentrations in milk and plasma during the bovine oestrous cycle. *Vet Rec.* 1975;96:222-3.
17. Mucciolo RG, Barberio JC. Níveis de progesterona no plasma sanguíneo durante o ciclo estral e a gestação de vacas Nelore (*Bos indicus*). *Rev Bras Reprod Anim.* 1983;7:11-21.
18. Walters DL, Schallenberger E. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrus cycle in the cow. *J Reprod Fertil.* 1984;71:503-12.
19. Spano AA, Silva AAMR. Níveis plasmáticos de progesterona durante o ciclo estral e na fase inicial da gestação em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*). *Ars Vet.* 1992;8:131-41.
20. Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JM. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology.* 1997;47:1489-505.
21. Knights M, Smith GW. Decreased ACTH secretion during prolonged transportation stress is associated with reduced pituitary responsiveness to tropic hormone stimulation in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 2006;33:442-50.
22. Maziero RRD, Martins AC, Mollo MR, Martin I, Bastos MR, Ferreira JCP, et al. Ovarian function in cows submitted to acute stress during proestrus. *Livest Sci.* 2011;138:105-8.
23. Buckham Sporer KR, Weber PSD, Burton JL, Earley B, Crowe MA. Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress. *J Anim Sci.* 2008;86:1325-34.

Recebido em: 19/07/12

Aceito em: 25/05/12

**DETECÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis EM OVOS DE CODORNAS JAPONESAS
(*Coturnix coturnix japonica* - TEMMINCK E SCHLEGEL, 1849) SUBMETIDAS A
ESTRESSE CÍCLICO PELO CALOR***

Edson Ryuiti Katayama¹

Taís Cremasco Donato²

Francine Vercese²

Edivaldo Antonio Garcia³

Adriano Sakai Okamoto³

Raphael Lucio Andreatti Filho³

RESUMO

Ovos consumidos crus ou em alimentos sem tratamento adequado foram identificados como responsáveis por surtos de infecção humana causada por *Salmonella* spp. A qualidade da casca dos ovos exerce influência na entrada da bactéria presente na superfície da casca para o interior dos ovos. Ovos com baixos valores de gravidade específica são mais susceptíveis a penetração por *Salmonella*. Poedeiras sob condições de estresse térmico podem apresentar diminuição do consumo de ração e da gravidade específica dos ovos. Desta forma, objetivou-se avaliar a contaminação por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis (SE) em ovos de codornas japonesas submetidas a estresse cíclico pelo calor. Foram utilizados ovos provenientes de 144 codornas japonesas submetidas a dois tratamentos assim dispostos: T1 – aves em temperatura ambiente constante de 21°C e T2 – aves em temperatura ambiente cíclica e crescente, partindo dos 21°C até atingir 33°C, e no final deste período os ovos foram coletados. Nos períodos de zero, 24, 96 e 168 horas após a imersão dos ovos em caldo contendo SE, os ovos foram examinados para verificar a quantidade de SE na casca e no conteúdo interno. Durante o armazenamento a 25°C, a quantidade de SE na casca foi decrescente. Nos períodos de 96 e 168 horas de armazenamento, somente no T2, com temperatura final de 33°C, detectou-se SE no conteúdo interno dos ovos, demonstrando que ovos provenientes de codornas mantidas em condições de estresse térmico pelo calor oferecem maiores riscos à saúde pública.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, saúde pública, ovos de codorna, microbiologia de alimentos.

* Fonte financiadora: CNPq.

¹ Médico Veterinário da Brasil Foods S.A., Rodovia BR 060 Km 394, s/n, Rio Verde, GO, 75.901-970, erkatayama@gmail.com.

² Alunos de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista – UNESP/Botucatu, tais.donato@yahoo.com.br. • Correspondência: Taís Cremasco Donato. Hospital Veterinário, s/n, Laboratório de Ornitopatologia – Prédio da Patologia, Distrito de Rubião Junior – Botucatu – São Paulo, 18618-970. (14) 3880-2073 ou (14) 8142-3063. tais.donato@yahoo.com.br ou erkatayama@gmail.com.

³ Docentes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista - UNESP, Distrito de Rubião Júnior, s/n°, Botucatu, SP, 18.618-970, andreatti@fmvz.unesp.br.

DETECTION OF *Salmonella* Enteritidis IN EGGS OF JAPANESE QUAIL (*Coturnix coturnix japonica* - TEMMINCK E SCHLEGEL, 1849) SUBMITTED TO CYCLIC HEAT STRESS

ABSTRACT

Eggs or foods eaten raw without using adequate treatment were identified as responsible for outbreaks of human infection by *Salmonella* spp. The quality of shell eggs influences the entry of *Salmonella* spp. present on the surface of the shell to the inside of the eggs. Eggs with low specific gravity values are more susceptible to penetration by *Salmonella*. Layers under conditions of heat stress may have reduced feed intake and specific gravity of eggs. Thus, the objective was to evaluate the contamination of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis (SE) in eggs of Japanese quail subjected to cyclic heat stress. Were used 144 eggs from Japanese quail subjected to two treatments as it follows: T1 - quail at room temperature of 21 ° C and T2 - birds and increasing cyclic temperature, starting from 21 ° C until it reaches 33 ° C, and end of this period the eggs were collected. During periods of zero, 24, 96 and 168 hours after immersion of eggs in broth containing SE, the eggs were examined to check the amount of SE in shell and internal contents. The amount of SE in shell during storage at 25 ° C was decreasing. In periods of 96 and 168 hours of storage, only at T2 (33 ° C) was detected SE in the internal content of the eggs in the experimental conditions, demonstrating that the eggs of quail kept under conditions of heat stress presents greater risks for public health.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, public health, quail eggs, food microbiology.

DETECCIÓN DE *Salmonella* Enteritidis EN HUEVOS DE CODORNIZ JAPONESA (*Coturnix coturnix japonica* - TEMMINCK E SCHLEGEL, 1849) SOMETIDAS A ESTRÉS CÍCLICO POR CALOR

RESUMEN

Los alimentos que contienen huevos sin un tratamiento adecuado fueron identificados como los principales responsables de brotes de infección causada por bacterias del género *Salmonella* en humanos. La calidad de la cáscara tiene influencia directa en la migración de bacterias presentes en la superficie hacia el interior del huevo. Así, los huevos con densidad específica baja son más susceptibles a la penetración por *Salmonella*. Las ponedoras en condiciones de estrés por calor pueden reducir el consumo de alimento y por lo tanto producir huevos con baja gravedad específica. El objetivo de este trabajo fue evaluar la contaminación por *Salmonella* enterica subespecie enterica serotipo Enteritidis (SE) en los huevos de codorniz japonesa sometida a estrés cíclico por calor. Se utilizaron 144 huevos de codorniz japonesa sometidos a los siguientes tratamientos: T1 - aves en temperatura ambiente constante de 21 ° C y T2 - aves sometidas a incremento cíclico de temperatura, de 21 ° C hasta 33° C. Los huevos fueron recolectados al final de este período. Cero, 24, 96 y 168 horas después de inmersión en un caldo con SE, los huevos fueron examinados para verificar la cantidad de SE en la cáscara y en su interior. La cantidad de SE en la cáscara durante el almacenamiento a 25 ° C fue disminuyendo. Después de 96 y 168 horas de almacenamiento, los huevos del T2 con temperatura final de 33° C presentaron SE únicamente en su interior, lo que muestra que los huevos de codorniz mantenidos en condiciones de estrés térmico por calor representan mayor riesgo para la salud pública

Palabras clave: *Salmonella* Enteritidis, salud pública, huevos de codorniz, microbiología de los alimentos.

INTRODUÇÃO

As salmoneloses aviárias são doenças provocadas por bactérias do gênero *Salmonella* e a infecção humana geralmente ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, especialmente por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis (SE) (1). Ovos consumidos crus ou em alimentos sem tratamento adequado foram identificados como os principais responsáveis por surtos de infecção humana por *Salmonella* spp. (2).

A contaminação bacteriana de ovos pode ocorrer antes, via ovariana ou na passagem do ovo pelo oviduto; ou após a postura, por deficiências na higiene, presença de rachaduras ou defeitos na casca (3, 4).

O resfriamento rápido do ovo após a postura é o principal fator que predispõe a contaminação interna, pois o ovo ao sair pela cloaca está a 42°C (mesma temperatura interna da ave), porém, em contato com o ambiente há uma diminuição da sua temperatura interna, o que provoca a formação de uma pressão negativa em seu interior e permite a entrada de *Salmonella* Enteritidis presente em sua superfície (5).

A cutícula, casca, membranas internas e albúmen são estruturas presentes nos ovos que protegem a gema de contaminação microbiana (6). As membranas da casca retêm o fluido do albúmen e agem como um filtro, promovendo resistência à invasão bacteriana. Em ovos de codornas japonesas, esta membrana é mais resistente, quando comparada com ovos de galinhas poedeiras (7). Entretanto, o uso de um inóculo com alta concentração bacteriana e a permanência dos ovos em temperaturas de 37°C pode facilitar a penetração bacteriana, mesmo com uma membrana interna resistente (8).

Dependendo da qualidade da casca, condições de higiene, tempo e temperatura de estocagem, bactérias como *Salmonella* spp. presentes na superfície da casca de ovos podem penetrar em seu interior (3, 9-11). Podem inclusive invadir o conteúdo de ovos de casca íntegra (12). Outros fatores também interferem nesta invasão, como o esfriamento natural do ovo após a postura, umidade do ar e tratamentos da superfície da casca (13).

A qualidade e espessura da casca estão relacionadas intimamente com a gravidade específica dos ovos. Segundo Hamilton (14), a gravidade específica aumenta à medida que a espessura da casca aumenta, ou seja, os valores estão diretamente relacionados. Ovos com gravidade específica elevada apresentaram um menor índice de contaminação quando comparados com ovos de gravidade específica menor. Portanto, ovos com baixos valores de gravidade específica são mais susceptíveis a penetração por *Salmonella* spp. (13). A relação entre a gravidade específica, espessura e percentual de casca com resistência à quebra foi avaliada por Vercese (15) que demonstraram uma redução de resistência de casca a quebra em temperaturas acima de 21°C, sendo que a partir de 27°C a espessura da casca foi reduzida e com 30°C houve uma diminuição da gravidade específica.

Dados semelhantes foram observados por Franco-Jimenez et al. (16), que trabalharam com linhagens genéticas de poedeiras comerciais e as submetem ao estresse por calor a 35°C, por duas semanas. Houve redução em 3% ou mais na produção de ovos, consumo de ração, espessura da casca e gravidade específica quando comparados com aves mantidas em temperatura ambiente (22°C).

Mashaly et al. (17) submetem aves poedeiras de 31 semanas a três tratamentos em câmara bioclimática, com temperaturas cíclicas e sob condições de estresse térmico constante de 35°C e 50% de umidade relativa. Como resposta, os autores verificaram que o ganho de peso das aves e o consumo de ração foram significativamente reduzidos nas condições de estresse, bem como o peso dos ovos, espessura e peso de casca, e a gravidade específica.

Em condições de estresse térmico, há uma diminuição no consumo de ração, pois o alimento aumenta o metabolismo e, conseqüentemente, a quantidade de calor corporal, porém, a diminuição na ingestão de nutrientes afeta diretamente a produtividade (18). Durante

períodos de altas temperaturas, galinhas poedeiras também são afetadas por alterações no equilíbrio ácido-básico, que desencadeiam um desequilíbrio eletrolítico e mineral. Isto ocorre devido à maior perda de CO₂ causada pelo aumento da frequência respiratória. A alcalose reduz a concentração de cálcio livre no sangue e aumenta a proporção de cálcio ligado à proteína ou complexado com ácidos orgânicos, podendo resultar em ovos de casca fina (19).

A temperatura ambiente ideal (termoneutra) para codornas na fase de postura está entre 18 e 22°C (20). A zona de termoneutralidade está relacionada com o ambiente térmico ideal, no qual a amplitude é bem estreita. Nesta, o animal alcança seu potencial máximo e a temperatura corporal é mantida com mínima utilização de mecanismos termorreguladores (21).

Desta forma, o presente estudo avaliou a contaminação pós-postura por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis em ovos, contaminados experimentalmente, de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) alojadas em diferentes temperaturas ambientais (termoneutra e estresse térmico pelo calor) e armazenados por diversos períodos em temperatura ambiente de 25 C.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 72 ovos em período inferior a 24 horas após a postura, provenientes de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) com 36 semanas de idade. As aves foram alojadas em duas salas, com três gaiolas cada, com câmara bioclimática. O aquecimento das salas foi realizado com o auxílio de aquecedores elétricos acoplados a um termostato e o resfriamento pela utilização de aparelhos de ar condicionado, dotados de controle automático de temperatura. O programa de luz adotado foi de 17 horas de luz diária. Durante todo o período experimental, as aves foram submetidas a idêntico manejo alimentar, sendo fornecidas água e ração à vontade. O arraçoamento foi realizado duas vezes ao dia. As dietas foram isonutritivas, compostas por milho e farelo de soja, fornecendo 2.800 kcal de EM/kg de ração, 20% de proteína bruta, 3,2% de cálcio, 0,35% de fósforo disponível, 0,45% de metionina, 0,76% de metionina + cistina e 1,07% de lisina, de acordo com as exigências nutricionais propostas pelo NRC (1994).

Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, constituído de dois tratamentos com três repetições contendo 24 aves cada, assim dispostos:

T1 – aves em temperatura ambiente de 21°C;

T2 – aves em temperatura ambiente cíclica e crescente.

No T2 as aves foram expostas as temperaturas testadas durante 10 horas diárias (das 8:00 as 18:00h). A temperatura inicial foi de 21°C, e esta, a cada período de 14 dias foi elevada para as seguintes temperaturas: 24°C, 27°C, 30°C, 33°C, permanecendo a 33°C por 14 dias também. No final deste período, os ovos foram coletados em uma única coleta às oito horas da manhã.

Os ovos coletados foram imersos durante três minutos em um inóculo de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis fagotipo 4, isolada de fígado de matrizes pesadas, mutante resistente ao ácido nalidíxico (Nal) e rifampicina (Rif), desenvolvida em meio de cultivos sucessivos em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100g/mL de meio) e rifampicina (100g/mL de meio).

O inóculo foi previamente incubado em caldo infusão cérebro e coração (ICC) a 40°C durante 12 horas e, no momento do uso, diluído 100 vezes em água peptonada tamponada (APT), contendo 10⁶ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). A concentração de SE no inóculo foi determinada por meio de diluições decimais seriadas em água peptonada tamponada (APT), com posterior plaqueamento em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico e rifampicina.

Os ovos foram mantidos em SE sob temperatura ambiente de 25°C e no momento zero, 24, 96 e 168 horas após imersão foram examinados para verificar a quantidade de SE na casca e conteúdo interno.

Para avaliação da contaminação da casca, um *pool* de três ovos foi colocado durante três minutos em bolsas plásticas contendo 75 mL de APT e, diluições decimais seriadas em APT foram plaqueadas em duplicata de AVB acrescido de Nal e Rif. Posteriormente, imergiram-se os ovos em solução de etanol a 70%, durante três minutos. Após secagem, estes foram quebrados assepticamente e 10mL do conteúdo interno foram misturados a 90mL de APT, repetindo-se este procedimento na quantificação de SE das cascas. Concomitantemente, 24 ovos excedentes foram examinados com o intuito de verificar contaminação prévia por *Salmonella* spp. (22).

RESULTADOS

As médias de temperatura ambiente máxima foram obtidas durante as 10 horas de exposição às temperaturas testadas e as médias de temperatura mínima foram obtidas durante a madrugada, quando o sistema de aquecimento encontrava-se desligado. Observa-se que média de variação entre as temperaturas máxima e mínima durante o período experimental, para as temperaturas testadas, foi de 3,93°C. Para a variável umidade relativa houve média de 72,4%, com variação de 12,38%.

Para a sala mantida em ambiente termoneutro, a temperatura foi de 21°C ± 2°C, com média de 53,64% para a umidade relativa durante todo o período experimental.

A quantidade de SE encontrada na casca e no interior dos ovos de codornas estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Detecção de SE (médias das 3 repetições em UFC/mL) nas cascas de ovos de codornas submetidas a temperaturas ambiente de 21 e 33°C, após zero, 24, 96 e 168 horas de armazenamento.

| Tratamentos | Local | Períodos de armazenamento | | | |
|-------------|-------|---------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| | | 0h | 24h | 96h | 168h |
| T1: 21°C | Casca | 2,0x10 ⁴ Aa | 5,0x10 ² Bb | 4,6x10 ¹ Bc | < 10 ⁰ Ad |
| T2: 33°C | Casca | 2,0x10 ⁴ Aa | 3,8x10 ³ Ab | 5,0x10 ² Ac | < 10 ⁰ Ad |

Letras maiúsculas distintas entre os tratamentos, dentro de cada período de armazenamento avaliado (coluna), e letras minúsculas distintas entre os períodos de armazenamento, dentro de cada tratamento avaliado (linha), diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 2. Detecção de SE (médias das 3 repetições em UFC/mL) no conteúdo interno de ovos de codornas submetidas a temperaturas ambiente de 21 e 33°C, após zero, 24, 96 e 168 horas de armazenamento.

| Tratamentos | Local | Períodos de armazenamento | | | |
|-------------|---------|---------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| | | 0h | 24h | 96h | 168h |
| T1: 21°C | Interno | < 10 ⁰ Aa | < 10 ⁰ Aa | < 10 ⁰ Ba | < 10 ⁰ Aa |
| T2: 33°C | Interno | < 10 ⁰ Ab | < 10 ⁰ Ab | 4,3x10 ¹ Aa | 1,0x10 ¹ Aa |

Letras maiúsculas distintas entre os tratamentos, dentro de cada período de armazenamento avaliado (coluna), e letras minúsculas distintas entre os períodos de armazenamento, dentro de cada tratamento avaliado (linha), diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

DISCUSSÃO

A quantidade de SE na casca durante o armazenamento a 25°C foi decrescente em ambos os tratamentos, sendo que após 168 horas, não foi mais detectada SE na casca em nenhum dos tratamentos, contrariando os resultados observados em alguns estudos com ovos de galinhas poedeiras, onde se detectou quantidades significativas de SE durante todo o período de análise (2, 3, 11, 22).

Nos períodos de 96 e 168 horas de armazenamento, somente em ovos oriundos de aves submetidas à temperatura de 33°C, observou-se SE em seu conteúdo interno, nas condições experimentais deste trabalho, indicando que a alta temperatura ambiental que as aves foram expostas provocou modificações na casca, permitindo a entrada de SE no interior dos ovos após um período de 24 horas à 96 horas de armazenamento. Estes resultados concordam com o observado por Oliveira e Silva (23) em ovos de galinhas poedeiras, que trabalhando isoladamente com gema, constataram a contaminação desta por SE, proveniente da casca, a partir de 24 horas após contaminação artificial.

Dados semelhantes também foram observados por Franco-Jimenez et al. (16), em galinhas poedeiras comerciais submetidas ao estresse por calor durante duas semanas, onde ocorreu redução no consumo de ração, espessura da casca e gravidade específica.

Portanto a diminuição da gravidade específica do ovo, presença de rachaduras ou defeitos nas cascas podem facilitar a contaminação do conteúdo interno dos ovos.

CONCLUSÕES

Condições de estresse cíclico pelo calor afetam negativamente a qualidade dos ovos, o que poderá facilitar a contaminação bacteriana do seu conteúdo interno. Portanto, a adoção de tecnologias que controlem a temperatura ambiente, principalmente em regiões de clima quente, além de melhorar o bem-estar animal, melhora a qualidade dos ovos e a segurança do alimento, fatores importantes para a manutenção da escala de produção, exportação e conquista de novos mercados.

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, sendo o experimento aprovado pela mesma (Protocolo nº 164/2008-CEUA) em 26 de agosto de 2008.

REFERÊNCIAS

1. Andreatti Filho RL. Paratifo aviário. In: Saúde aviária e doenças. São Paulo: Roca; 2007. p.96-106.
2. Gast RK, Beard CW. Detection and enumeration of *Salmonella* Enteritidis in fresh and stored eggs laid by experimentally infected hens. *J Food Prot.* 1992;55:152-6.
3. Humphrey TJ, Whitehead AH, Gawler AHL, Henley A, Rowe B. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs. *Epidemiol Infect.* 1991;106:489-96.
4. Mayes FJ, Takaballi MA. A microbial contamination of the hen's egg: a review. *J Food Prot.* 1983;46:1092-8.
5. Cox NA, Berrang ME, Cason JA. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs – a review. *Poult Sci.* 2000;79:1571-4.
6. Tranter HS, Board RG. The antimicrobial defense of avian eggs: biological perspective and chemical basis. *J Appl Biochem.* 1982;4:295-338.
7. Burley RW, Vadehra DV. *The avian egg: chemistry and biology.* New York: John Wiley and Sons; 1989.
8. Williams JE, Dillard LH, Hall GO. The penetration patterns of *S. typhimurium* through the outer structures of chicken eggs. *Avian Dis.* 1968;12:445-66.
9. Humphrey TJ. Growth of salmonellas in intact shell eggs: influence of storage temperature. *Vet Rec.* 1990;126:292.
10. Padron MN. *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Dis.* 1990;34:463-5.
11. Schoeni JL, Glass KA, Mcdermott JL, Wong ACL. Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. *Int J Food Microbiol.* 1995;24:385-96.
12. Berrang ME, Cox NA, Frank JF, Buhr RJ. Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: a review. *J Appl Poult Res.* 1999;8:499-504.
13. Sauter EA, Petersen CF. The effect of egg shell quality on penetration by various *Salmonellae*. *Poult Sci.* 1974;53:2159-62.
14. Hamilton RMG. Methods and factors that affect measurement of egg shell quality. *Poult Sci.* 1982;61:2002-39.
15. Vercese F. Efeito da temperatura sobre o desempenho e a qualidade dos ovos de codornas japonesas [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2009.

16. Franco-Jimenez DJ, Scheideler SE, Kittok RJ, Brown-Brandil TM, Robeson LR, Taira H, et al. Differential effects of heat stress in three strains of laying hens. *J Appl Poult Res.* 2007;16:628-34.
17. Mashaly MM, Hendrics GL, Kalama MA, Gehad AE, Abbas AO, Patterson PH. Effect of heat stress on production parameters and immune response of commercial laying hens. *Poult Sci.* 2004;83:889-94.
18. Teeter RG. Otimização da produtividade em frangos de corte durante o estresse calórico. In: *Anais do 1º Simpósio Técnico Planalquímica*; 1989, São Paulo. São Paulo: Planalquímica; 1989. p.17-40.
19. Furlan RL. Produtividade vs. Comportamento animal. In: *Anais do 7º Congresso de produção, comercialização e consumo de ovos*; 2009, São Pedro. São Pedro: APA; 2009. p.124-41.
20. Murakami AE, Arika J. Produção de codornas japonesas. Jaboticabal: FUNEP;1998.
21. Silva IJO, Nãs IA, Buckln RA. Evaluation of egg production housing in hot 50 climate. Atlanta: ASAE; 1994. Paper ASAE, 94.4567.
22. Barros MR, Andreatti Filho RL, Lima ET, Sampaio HM, Crocci AJ. Survival of *Salmonella* Enteritidis in eggs artificially contaminated, after disinfection and stored at different temperatures. *Rev Bras Cienc Avic.* 2001;3:219-223.
23. Oliveira DD, Silva EN. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2000;52:655-61.

Recebido em: 06/12/11

Aceito em: 28/05/12

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE COLETA E COLORAÇÃO PARA CITOLOGIA CONJUNTIVAL EM CÃES NORMAIS

Renata Fuentes Borges¹
Karym Christine de Freitas Cardoso²
Aline Adriana Bolzan³
Cláudia Momo⁴
Cristiane dos Santos Honsho⁵

RESUMO

Duas técnicas de colheita e duas técnicas de coloração de amostras conjuntivais foram avaliadas a fim de se disponibilizar ao clínico veterinário uma alternativa de baixo custo, fácil execução e interpretação no auxílio ao diagnóstico de desordens da superfície ocular. Estudaram-se quatro grupos experimentais, com 13 cães cada: GDAPR – citologia por abrasão por escova, olho direito, Panótico rápido; GEIPN – citologia por impressão de papel filtro com transferência, olho esquerdo, Papanicolaou; GDAPN – abrasão por escova, olho direito, Papanicolaou e GEIPR – citologia por impressão de papel filtro com transferência, olho esquerdo, Panótico rápido. Cada grupo foi avaliado quanto ao custo, tempo e à facilidade de confecção das lâminas, assim como ao resultado final na observação por microscopia óptica, quanto à preservação da morfologia e caracterização das estruturas celulares, como núcleo, nucléolo e citoplasma, homogeneidade e intensidade da coloração e presença de artefatos. O método de abrasão com escova propiciou lâminas com maior riqueza de células enquanto o método de citologia por impressão com transferência permitiu a colheita sem anestesia tópica e necessitou de papel filtro apropriado, o que encareceu o procedimento. Ambas as colorações permitiram a identificação de diferentes células. A coloração pelo método Panótico foi de execução mais rápida, fácil e de menor custo. A coloração de Papanicolaou favoreceu a diferenciação entre as células e, conseqüentemente, maior acurácia no exame. Na rotina de uma clínica veterinária, o método de colheita por abrasão com escova e a coloração Panótico seriam boa escolha devido à facilidade e rapidez na realização e confecção das lâminas, indicando-se, porém, a coloração Papanicolaou em casos de neoplasias.

Palavras-chave: conjuntiva, Papanicolaou, Panótico rápido, células conjuntivais, microscopia

COMPARATIVE STUDY OF METHODS OF HARVESTING AND STAINING FOR CONJUNCTIVAL CYTOLOGY IN NORMAL DOGS

ABSTRACT

Two harvesting techniques and two techniques of conjunctival staining samples were evaluated in order to provide the veterinary practitioner a low-cost, easy implementation and interpretation aid in the diagnosis of ocular surface disorders. We studied four experimental groups of 13 dogs each: GDAPR – brush cytology, right eye, Diff quick stain; GEIPN - impression cytology with transfer, left eye, Papanicolaou; GDAPN - brush cytology, right

¹ Graduação Medicina Veterinária – Universidade de Franca

² Pós-Graduação Medicina Veterinária – Universidade de Franca

³ Departamento de Cirurgia Veterinária – Universidade de São Paulo

⁴ Medicina Veterinária – Universidade de Franca

⁵ Programa de Mestrado em Medicina Veterinária de Pequenos Animais - Oftalmologia veterinária – Universidade de Franca

eye, Papanicolaou and GEIPR - impression cytology with transfer, left eye, Diff quick. The groups were evaluated for cost, time and ease of manufacture of the blades, optical microscopy and evaluated the preservation of cellular morphology, uniformity of color, the presence of artifacts and the staining intensity as well as characterization of cell structures. The brush cytology blades provided with richer cells while the method of impression cytology with transfer allowed the harvest without topical anesthesia and required appropriate filter paper, which is an expensive procedure. Both staining allowed the identification of different cells. The Diff quick stain was presented more quickly and easily, in relation to the execution, at lower cost. The Papanicolaou stain favored the characterization of cells and hence the reading of the slides. In the veterinary clinic, the method of harvesting by brush abrasion and Diff quick stain would be good choice because of the ease and speed of implementation and preparation of slides, indicating, however, the Papanicolaou stain in suspected tumor.

Keywords: conjunctiva, Papanicolaou, Diff quick, conjunctival cells, microscopy.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE COLECTA Y TINCIÓN DURANTE LA CITOLOGÍA CONJUNTIVAL EN LOS PERROS NORMALES

RESUMEN

Fueron evaluadas dos técnicas de colecta y dos técnicas de tinción de muestras conjuntivales con el fin de ofrecer al profesional veterinario un bajo costo así como una fácil implementación e interpretación en el diagnóstico de trastornos de la superficie ocular. Se estudiaron cuatro grupos experimentales de 13 perros cada uno: GDAPR - citología por cepillado del ojo derecho, Panóptico rápido; GEIPN - citología de impresión con papel filtro del ojo izquierdo, Papanicolaou; GDAPN - cepillado del ojo derecho, GEIPR y Papanicolaou - citología de impresión con papel filtro del ojo izquierdo, Panóptico rápido. Cada grupo fue evaluado según costo, tiempo y facilidad para la elaboración de las láminas, así como el resultado final en la observación al microscopio óptico, la preservación de la morfología celular, la uniformidad del color, la presencia de artefactos, y la intensidad de la tinción y la caracterización de las estructuras celulares. El método de citología por cepillado proporcionó las láminas con el mayor número de células mientras que el método de citología de impresión permitió la colecta sin anestesia tópica; sin embargo este último método requirió el uso de papel filtro adecuado, lo que encareció el procedimiento. Ambas tinciones permitieron la identificación de las diferentes células. La elaboración de láminas para Panóptico rápido fue más rápida, más fácil y más barata. El Papanicolaou favoreció la caracterización de las células y por lo tanto facilitó la lectura de las láminas. En la rutina de una clínica veterinaria, el método de colecta por cepillado acompañado de tinción por Panóptico rápido sería una buena elección debido a la facilidad y velocidad para la preparación de las láminas. Sin embargo, la tinción de Papanicolaou es más indicada en los casos de sospecha de neoplasia.

Palabras clave: conjuntiva, Papanicolaou, Panóptico rápido, células de la conjuntiva, microscopía.

INTRODUÇÃO

A conjuntiva ocular atua na dinâmica lacrimal, confere proteção imunológica ao globo ocular, auxiliando na movimentação e na cicatrização corneal (1-3). Em decorrência da íntima relação entre a conjuntiva e as estruturas intra e extraoculares, interpretar adequadamente, suas alterações é fundamental para o diagnóstico de afecções da superfície ocular, como as conjuntivites (1, 4). O diagnóstico e o tratamento da conjuntivite são práticas comuns, mas a

identificação da causa subjacente não é. (4). Nesses casos, a citologia ou a biopsia conjuntival podem auxiliar o clínico a estabelecer sua patogênese (1).

A citologia compreende o estudo individualizado de células, não se considerando a estrutura do tecido ou órgão de origem (5, 6). Diversos materiais podem ser empregados para colheita de amostras de conjuntiva, como: zaragatoas, escovas, espátulas, lâminas e papel filtro, utilizado na citologia por impressão (7-9). Trata-se de método valioso, de baixo custo, simples e acessível para diagnóstico, monitoramento e propiciando tratamento de doenças da superfície ocular (5, 7, 9, 10). Entretanto, para sua interpretação, nas enfermidades conjuntivais, faz-se necessária a obtenção de um padrão de normalidade, que possibilite a comparação e, assim, estabelecer ou não a presença de alteração (11). A citologia conjuntival é indicada nos casos de úlceras profundas em progressão, ou em *melting*; abscessos corneais ou conjuntivais, ceratitides ou conjuntivites severas não responsivas à terapia, ou ainda, nos casos de nodulações em córnea, conjuntiva ou terceira pálpebra (9).

A abrasão com escova é uma técnica de qualidade e de fácil execução (7, 9, 12, 13), e tida como superior à colheita com espátula devido à riqueza de células da amostra, incluindo as das camadas mais profundas obtidas de forma menos invasiva, à preservação da morfologia celular com menor sobreposição de células e, principalmente, ao menor desconforto suscitado ao paciente (7, 12, 13).

A citologia por impressão, por tratar-se de técnica que fornece informações mais detalhadas, comparativamente a qualquer outro método convencional, sobre a localização anatômica de cada segmento e seus respectivos componentes celulares, demonstra ser ferramenta útil na identificação de grande variedade de doenças oculares, como neoplasias e ceratoconjuntivite seca (11, 12, 14-16).

A técnica consiste na aplicação de papel filtro sobre a superfície ocular e permite obter amostras com uma a três camadas de células epiteliais, preservando as características morfológicas e a relação anatômica intercelular (11, 15-18). O material colhido pode ser submetido à análise histológica, imunoistoquímica ou molecular (18). A coloração do papel filtro apresenta maior complexidade, conferindo-lhe certa desvantagem, comparativamente à citologia por escova, na qual várias técnicas de coloração das lâminas podem ser empregadas (13). Neste sentido, Luzeau et al. (19) e Carlier et al. (20, 21) propuseram uma forma simplificada de citologia por impressão, na qual o material colhido é transferido para a lâmina pressionando-se o papel filtro contra a mesma com o auxílio do dedo. Com esta modificação, diminui-se o custo e a complexidade relativos à coloração do papel, preservando-se as vantagens da técnica (19-21).

Há vários tipos de corantes e suas combinações disponíveis para citologia (6, 22). As colorações do tipo Romanowsky, que incluem os corantes de Wright, Giemsa e Diff-Quik (Panótico rápido), e a de Papanicolaou, com suas variações, são as mais preconizadas (22). Em medicina veterinária, a escolha pelas técnicas de colorações tipo Romanowsky fundamenta-se, principalmente, no baixo custo, na praticidade e facilidade de execução aliada à qualidade dos resultados. Por outro lado, o uso da coloração de Papanicolaou tem destaque, em medicina humana, por exibir maior riqueza de detalhes nucleares (22, 23), especialmente em células neoplásicas (5).

Por ser a citologia conjuntival, no Brasil, ainda pouco empregada em medicina veterinária, propomo-nos, ao conceber este estudo, comparar duas técnicas de colheita de amostras citológicas conjuntivais e duas técnicas de coloração sob condições que mimetizem a rotina na clínica de pequenos animais e cotejá-las quanto ao custo, à facilidade de colheita e confecção das lâminas, bem como ao resultado final na preservação da morfologia e detalhes de estruturas celulares. Pretende-se, dessa forma, esclarecer e fornecer ao médico veterinário, opções de escolha quanto a este método auxiliar ao diagnóstico de afecções oftálmicas (24).

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada obedecendo-se aos critérios da *Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (25) e sob a anuência e vigilância do Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais (CEUA), sob o número 006/09-A, de 12 de março de 2009.

Neste estudo, foram coletadas amostras conjuntivais de 13 cães, machos ou fêmeas, com peso médio de 20 kg. Os animais foram selecionados após ser constatada a ausência de afecções oftálmicas ou sistêmicas que pudessem interferir nos resultados obtidos. Foram constituídos quatro grupos experimentais, a saber: Grupo DAPr (GDAPr, n=13) - colheita das amostras conjuntivais, nos olhos direitos, por método de abrasão com escova e coloração Panótico rápido⁶; Grupo EIPn (GEIPn, n=13) - colheita das amostras conjuntivais, nos olhos esquerdos, por método de impressão com transferência e coloração Papanicolaou⁷; Grupo DAPn (GDAPn, n=13) - colheita das amostras conjuntivais, nos olhos direitos, por método de abrasão com escova e coloração Papanicolaou; Grupo EIPr (GEIPr, n=13) - colheita das amostras conjuntivais, nos olhos esquerdos, por método de impressão com transferência e coloração Panótico rápido.

A colheita das amostras conjuntivais pelo método de abrasão com escova foi realizada utilizando-se escovas coletoras estéreis para amostragem de células endocervicais⁸, destinando-se uma escova para cada colheita. Previamente à colheita das amostras, instilou-se colírio à base de proximetaína a 0,5%⁹ para dessensibilização da superfície ocular. Após um minuto, a escova foi introduzida no saco conjuntival inferior, sendo girada e atritada sobre a conjuntiva por seis vezes. Para o método de citologia de impressão por transferência, utilizaram-se tiras de papel filtro¹⁰ com poros de 0,22 µm, recortadas em formato retangular de 5 mm por 20 mm de comprimento, utilizando-se luvas de procedimento para o manipulador. A tira foi pressionada na conjuntiva palpebral inferior com o auxílio do dedo indicador, calçado com luva de procedimento, durante 10 segundos.

O material do GDAPr e do GDAPn foi distribuído sobre lâminas de vidro, rolando-se a escova cuidadosamente, até que todo o material fosse liberado. O material referente ao GEIPn e ao GEIPr, contido no papel filtro, foi transferido, imediatamente, às lâminas de vidro, pressionando-se, com o auxílio do dedo, o papel contra a lâmina em cinco locais, mantendo-se contato durante um segundo, em cada passagem.

Em seguida, procedeu-se à fixação das lâminas, imergindo-as imediatamente em álcool etílico a 92,8%. A coloração foi realizada, posteriormente, conforme as indicações do fabricante dos *kits*. A leitura foi realizada pela observação por microscopia óptica¹¹ e as imagens foram captadas por sistema de captura digital¹², pelo programa Motic Images Plus 2.0.

Os resultados foram avaliados quanto ao custo e à facilidade na colheita do material e na confecção das lâminas, assim como ao resultado final na observação microscópica da preservação da morfologia celular, homogeneidade da coloração, presença de artefatos, intensidade da coloração e evidenciação de estruturas celulares. Para cada lâmina foram contados dez campos microscópicos (40x) e as células diferenciadas em: superficiais queratinizadas sem núcleo (QS/Nuc.); superficiais queratinizadas com núcleo (QC/Nuc.); superficiais (Sup.); intermediárias (Int.) e caliciformes (Calic.).

⁶Panótico rápido - Laborclin produtos para laboratório Ltda.

⁷Papanicolaou - Newproo Produtos para Laboratório.

⁸Endobrush - Alamar Tecno Científica Ltda.

⁹Anestalcon - Alcon Laboratórios do Brasil Ltda.

¹⁰Papel filtro N02SPS4700 - Sigma Co./USA

¹¹Microscópio biológico binocular mod. Eclipse E200 - Nikon Instruments Inc./ Japan

¹²Câmera de Vídeo Digital Moticam 1000 com 1,3 megapixels - Motic Group Co. Ltd./China

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas adequações à técnica de citologia de impressão por transferência a fim de melhorar a quantidade de material colhido e qualidade das lâminas. A porosidade do papel filtro utilizada inicialmente era de 0,45 μm sendo substituída para 0,22 μm , pois ao se testar o papel com esta porosidade, verificou-se maior captação de células, comparativamente ao papel de porosidade 0,45 μm . Além disso, optou-se por transferir o material do papel para a lâmina, estabelecendo-se cinco contatos deste ao longo da lâmina com o tempo de um segundo em cada contato. Com isso, houve melhora na quantidade de material disposto sobre a lâmina, favorecendo também a leitura das mesmas.

Idealizou-se, inicialmente, que após a colheita, aguardar-se-ia o tempo para secagem do material sobre as lâminas e estas, então, seriam imersas em álcool etílico 92,8% durante um minuto, retiradas e alocadas em caixa próprias até sua coloração. Entretanto, observou-se que, seguindo este método, a dessecação do material prejudicou a qualidade da coloração (figuras 1A). Para obtenção de lâminas de boa qualidade, utilizando-se a coloração Papanicolaou, preconiza-se que a fixação imediata em álcool seja de, no mínimo, 15 minutos e, ainda, que as lâminas sejam mergulhadas novamente em álcool antes de se proceder a coloração (5, 26, 27). Assim, optou-se por mantê-las imersas no álcool até o momento da coloração e constatou-se considerável melhora na qualidade da coloração das lâminas (figura 1B).

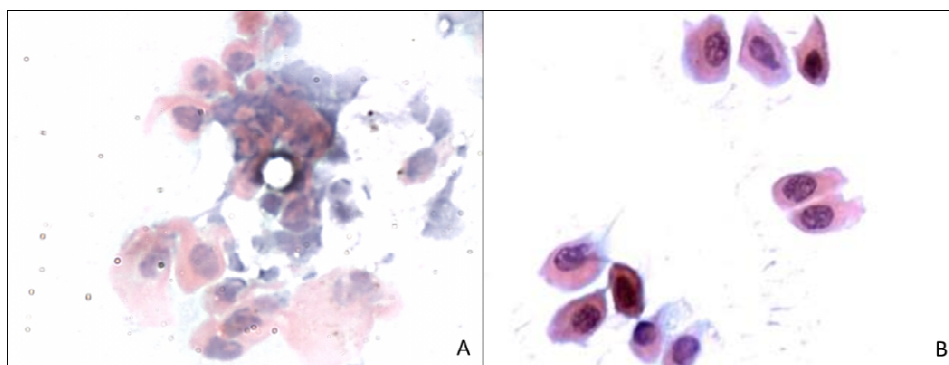


Figura 1. Fotomicrografias de células conjuntivais de cão colhidas por meio de abrasão com escova. Em A, fixação em álcool 92,8%; durante um minuto (Papanicolaou, 400X). Em B, fixação em álcool 92,8%, até o momento da coloração (Papanicolaou, 400X).

Quando do uso de colorações do tipo Romanowsky, como o Panótico rápido, a fixação, normalmente, é feita pela secagem ao ar livre e a coloração realizada em seguida (5, 24, 26). Entretanto, quando o material é fixado em álcool, a coloração Panótico propicia excelentes detalhes citológicos (26), como verificado neste estudo. Portanto, na impossibilidade de proceder-se com a coloração Panótico, imediatamente após a colheita, a permanência das lâminas em álcool pode ser indicada, mantendo-se bons resultados.

Não há como questionar a praticidade e a rapidez, bem como o baixo custo da coloração Panótico rápido, que fazem com que esta técnica seja a mais utilizada em medicina veterinária (10, 24, 26). Todavia, em humanos, a coloração Papanicolaou é bastante empregada, principalmente, em citologias esfoliativas, em que o campo celular muitas vezes é pobre e os detalhes nucleares importantes (26). Assim, apesar de propiciar a evidenciação de alterações nucleares em células neoplásicas (5, 24), por exemplo, outros organismos e detalhes citoplasmáticos não são bem evidenciados (24). Além disso, as 13 etapas do seu processamento que, neste estudo, duraram em média 30 minutos, comparativamente às três

etapas da coloração Panótico rápido, que duraram menos de um minuto, não a tornam prática para o uso clínico rotineiro (24).

Comparando-se as colorações, foi possível verificar que ambas permitiram a leitura e identificação das diferentes células. A coloração Panótico apresentou maior rapidez e facilidade em relação à confecção das lâminas, justificando seu uso na rotina de uma clínica veterinária, em que rapidez e agilidade são primordiais, além do baixo custo. A coloração Papanicolaou, embora tenha favorecido a diferenciação entre as células, o que em muitas ocasiões permitiu que a leitura da lâmina fosse mais rápida, apresenta maior custo e demora no treinamento do profissional para a confecção. Na rotina laboratorial, muitas vezes a coloração Panótico rápido acaba sendo mais utilizada (24), pelas vantagens supracitadas. Mas ressalta-se que a coloração Papanicolaou, apesar de dispendiosa e trabalhosa, fornece ao profissional maior facilidade e rapidez na diferenciação celular. Sendo assim, a familiaridade do profissional em relação à coloração, desde a deposição do material na lâmina até a sua leitura, deverá ser o fator determinante na escolha do melhor método de coloração.

Observando o GDAPr e o GDAPn (Tabela 1), nos quais as células foram colhidas pelo método de abrasão com escova, notou-se que apesar da presença de todos os tipos celulares, as células intermediárias (87,06% e 73,10%) e superficiais (6,23% e 11,56%) estiveram presentes em maior quantidade (figura 2 A, B, C e D). Observou-se, ainda, menor quantidade de células queratinizadas com núcleo, no GDAPr (1,25%), comparativamente ao GDAPn (10,65%). Tal observação pode ser atribuída ao tipo de corante utilizado no GDAPn (Papanicolaou), o qual facilitou a diferenciação celular à microscopia de luz, diminuindo, assim dúvidas advindas da constante transição morfológica sofrida pelas células, principalmente as superficiais e superficiais queratinizadas nucleadas, que podem ser confundidas facilmente.

Tabela 1. Porcentagem de células superficiais queratinizadas sem núcleo (QS/Nuc.), superficiais queratinizadas com núcleo (QC/Nuc.), superficiais (Sup.), intermediárias (Int.) e caliciformes (Calic.), verificadas nas amostras da citologia conjuntival dos cães dos Grupos GDAPr, GEIPn, GDAPn e GEIPr.

| Grupos | QS/Nuc | QC/Nuc. | Sup. | Int. | Calic. | Total |
|--------------|--------|---------|-------|-------|--------|-------|
| GDAPr | 5,34 | 1,25 | 6,23 | 87,06 | 0,12 | 100 |
| GEIPn | 65,10 | 30,45 | 3,78 | 0,67 | 0,00 | 100 |
| GDAPn | 4,55 | 10,65 | 11,56 | 73,10 | 0,14 | 100 |
| GEIPr | 73,40 | 16,75 | 9,22 | 0,63 | 0,00 | 100 |

Nos grupos em que a colheita foi realizada pelo método de impressão e transferência, grupo GEIPn e GEIPr, observou-se predominância de células superficiais queratinizadas com (30,45% e 16,75%) e sem núcleo (65,10% e 73,40%) e de superficiais (3,72% e 9,22%) (figura 3 A, B, C e D). As células intermediárias (0,67% e 0,63%) não apareceram em quantidade apreciável, visto que o método de colheita utilizado não esfolia o tecido, assim, somente as células mais superficiais e em processo de eliminação são apreendidas.

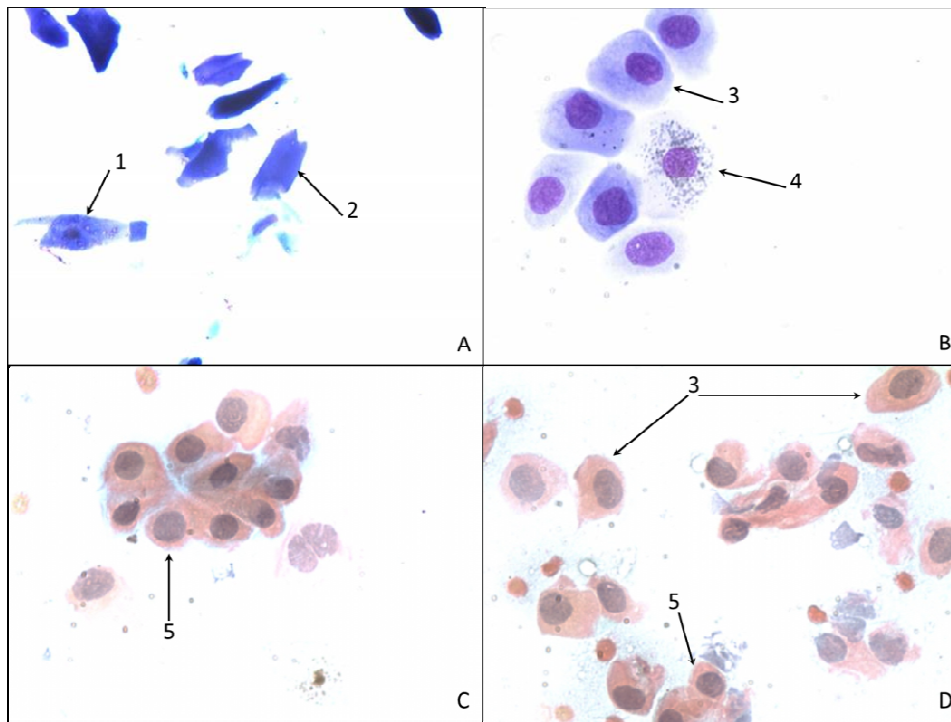


Figura 2. Notar em A (GDAPR), células queratinizadas com núcleo (1) e sem núcleo (2) (Panótico, 400x); em B (GDAPR), células superficiais (3) e uma célula caliciforme à direita (4) (Panótico, 400x); em C (GDAPn), células intermediárias (5) (Papanicolaou, 400x); em D (GDAPn), células superficiais (3) e intermediárias (5) (Papanicolaou, 400x).

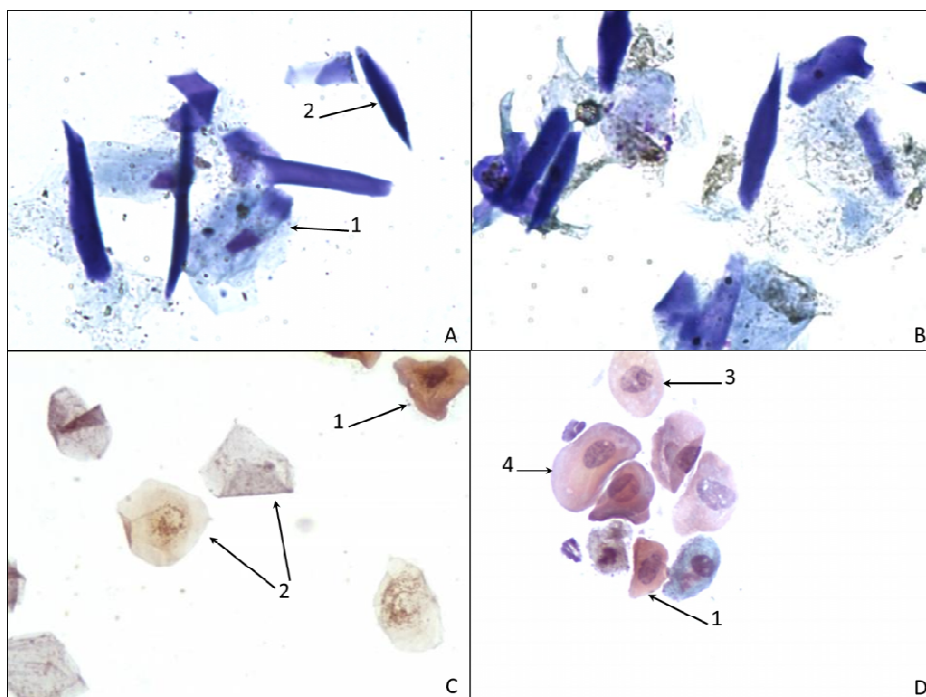


Figura 3. Notar em A (GEIPR), células superficiais queratinizadas com núcleo (1) e sem núcleo (2) (Panótico, 400x); em B (GEIPR), células queratinizadas sem núcleo (Panótico, 400x); em C (GEIPR), células superficiais queratinizadas com núcleo (1) e sem núcleo (2) (Papanicolaou, 400x); em D (GEIPR), células superficiais queratinizadas com núcleo (1), célula intermediária (3) e células superficiais (4) (Papanicolaou, 400x).

Não foram evidenciadas células inflamatórias no material recuperado por nenhum dos métodos avaliados, em consoante ao descrito por Lavach et al. (9), Murphy (5) e Willis et al.

(7), e contrariando o observado por Azevedo et al. (28), utilizando a colheita por zaragatoa e corado pelo método Panótico rápido.

Células caliciformes, embora raras (0,12% e 0,14%), puderam ser evidenciadas nos grupos GDAPr e GDAPn, respectivamente, corroborando os achados de Willis et al. (7). Como as células caliciformes são encontradas em maior concentração no fórnice inferior, entre as regiões nasal e medial (5, 29), pela abrasão por escova, o fórnice conjuntival não é alcançado e sim a conjuntiva palpebral, no canto medial e em algumas partes dos cantos nasal e temporal, justificando-se, assim, a reduzida celularidade. Da mesma forma, não foram encontradas células caliciformes com o uso da citologia por impressão, uma vez que o local designado para a colheita não representa área de concentração destas células (fórnice inferior).

Comparando-se os métodos de colheita testados, a abrasão com escova apresentou superioridade na quantidade, diversidade e morfologia, como já fora relatado por Bauer, Spiess e Lutz (12) e Yağmur et al. (13). Embora os últimos autores tenham utilizado a citologia por impressão na qual o papel de celulose é corado, concluíram que a citologia pelo método de abrasão por escova é vantajosa, pois provê maior amostra celular e de melhor qualidade morfológica.

Ainda, no método de abrasão por escova, verificou-se maior quantidade de células epiteliais de camadas distintas, entretanto, alterações morfológicas provenientes do rompimento da membrana citoplasmática e nuclear também foram observadas em pequena proporção (figura 4 A, B, C e D). Bauer, Spiess e Lutz (12), ao compararem quatro métodos de colheita, observaram que as células recuperadas por meio da escova apresentavam-se mais preservadas e melhor distribuídas sobre a lâmina, desde que fosse adotado certo cuidado ao rolar a escova sobre a lâmina. Willis et al. (7), observaram reduzida celularidade nas amostras colhidas por abrasão com escova, comparativamente às colhidas com o uso de espátula.

Apesar da maior riqueza de células observadas no método de abrasão com escova, muitas vezes estas se encontravam aglomeradas, dificultando sua contagem. Willis et al. (7) relataram em seu estudo, ao comparar as técnicas de colheita por abrasão por escova e raspagem com espátula, que em ambas as técnicas verificou-se grande diversidade celular, porém, na colheita com escova houve um menor número de células representativas das diferentes camadas e sobreposição celular.

Outra desvantagem deste método, relatada por Bauer, Spiess e Lutz (12), e observada neste estudo, foi a dificuldade na colheita do material, particularmente em animais de menor porte, com peso inferior a 15 kg, uma vez que a escova apresentava um tamanho superior ao da rima palpebral, prejudicando o acesso ao saco conjuntival. Nos demais animais, com peso médio de 20 kg e, conseqüentemente, rima palpebral maior, não houve dificuldade na colheita.

No método de impressão com transferência, não foram observadas células intermediárias em quantidade, visto que este procedimento propicia a colheita das células mais superficiais do epitélio e devido à natureza menos agressiva (13) do procedimento as alterações morfológicas foram mínimas.

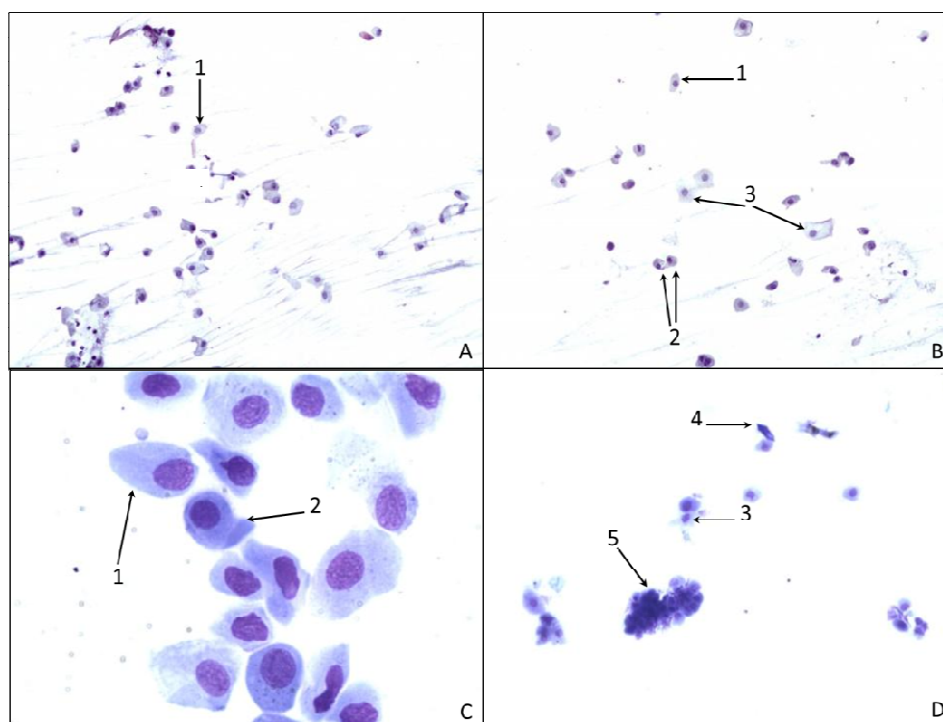


Figura 4. Notar em A (GDAPn), células superficiais (1) (Papanicolaou, 200x); em B (GDAPn), células superficiais (1), intermediárias (2) e superficiais queratinizadas com núcleo (3) (Papanicolaou, 200x); em C (GDAPR), presença de células superficiais (1) e intermediárias (2) (Panótico, 400x); em D (GDAPR), células queratinizadas com núcleo (3) e sem núcleo (4) e células aglomeradas (5) (Panótico, 200x).

CONCLUSÕES

Em relação aos métodos de colheita, o de abrasão com escova propiciou lâminas com maior riqueza de células, a despeito de muitas vezes estas estarem aglomeradas e, em alguns casos, destruídas. O método de citologia por impressão com transferência permitiu a colheita sem utilização de anestesia tópica, porém a necessidade de papel filtro específico, encareceu o procedimento. Além disso, a transferência de material do papel à lâmina acarretou perda na avaliação celular quantitativa das amostras.

Em relação às colorações, foi possível verificar que ambas permitiram a visualização e identificação de diferentes células. A coloração Panótico apresentou maior rapidez e facilidade em relação à confecção, bem como menor custo, viabilizando seu uso na rotina de uma clínica veterinária. A coloração Papanicolaou, embora tenha favorecido a caracterização das células, o que em muitas ocasiões permite que a leitura da lâmina seja mais rápida, apresenta custo elevado e maior tempo de aprendizado do profissional para a confecção das lâminas. Entretanto poder-se-ia acrescentar sua indicação a casos mais específicos, como suspeitas de neoplasias.

AGRADECIMENTOS

Projeto aprovado pelo CEUA, protocolo 006/09-A, em 12 de março de 2009.

REFERÊNCIAS

1. Hendrix DVH. Diseases and surgery of the canine conjunctiva. In: Gelatt KN. *Veterinary ophthalmology*. 3th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1999. p.619-34.
2. Walde I, Schäffer EH, Köstlin RG. *Atlas de clínica oftalmológica do cão e do gato*. 2a ed. São Paulo: Manole; 1998.
3. Samuelson DA. Ophthalmic anatomy. In: Gelatt KN. *Veterinary ophthalmology*. 3th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1999. p.31-150.
4. Slatter D. *Fundamentos de oftalmologia veterinária*. 3a ed. São Paulo: Roca; 2005.
5. Murphy JM. Exfoliative cytology examination as an aid in diagnosing ocular diseases in the dog and cat. *Semin Vet Med Surg Small Anim*. 1988;3(1):10-4.
6. Banks WJ. *Histologia veterinária aplicada*. 2a ed. São Paulo: Manole; 1992.
7. Willis M, Bounous DI, Hirsh S, Kaswan R, Stiles J, Martin C, et al. Conjunctival brush cytology: Evaluation of a new cytological collection technique in dogs and cats with a comparison to conjunctival scraping. *Vet Comp Ophthalmol*. 1997;7(2):74-81.
8. Strubbe DT, Gelatt KN. Ophthalmic examination and diagnostic procedures. In: Gelatt KN. *Veterinary ophthalmology*. 3th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1999. p.427-66.
9. Lavach JD, Thrall MA, Benjamin MM, Severin GA. Cytology of normal and inflamed conjunctivas in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*. 1977;170(7):722-7.
10. Jégou JP, Liotet S. The benefit of conjunctival scraping cytology in the biological diagnosis of conjunctivitis in the dog and cat. *Prat Med Chir Anim Comp*. 1991;26(6):567-80.
11. Brandão CVS, Minto BW, Rocha NS, Ranzani JJT. Citologia conjuntival por impressão em gatos (*Felis domestica*). *Rev Educ Contin Crmv-Sp*. 2002;5(1):41-7.
12. Bauer GA, Spiess BM, Lutz H. Exfoliative cytology of conjunctiva and cornea in domestic animals: a comparison of four collecting techniques. *Vet Comp Ophthalmol*. 1996;6(3):181-6.
13. Yağmur M, Ersöz C, Ersöz TR, Varinli S. Brush technique in ocular surface cytology. *Diagn Cytopathol*. 1997;17(2):88-91.
14. Rocha NS, Burine CHP, Lima LSA, Gonçalves RC, Thomassian A, Kamegasawa A. Uso da citologia por impressão nas doenças oculares externas no homem, bovino e equino. *Rev Educ Contin Crmv-Sp*. 2001;4(1):3-7.
15. Bolzan AA, Brunelli ATJ, Castro MB, Souza MA, Souza JL, Laus JL. Conjunctival impression cytology in dogs. *Vet Ophthalmol*. 2005;8(6):401-5.
16. Barros JN, Mascaro VLD, Gomes JAP, Freitas D, Lima ANH. Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e de coloração. *Arq Bras Oftalmol*. 2001;64(2):127-31.

17. Godoy-Esteves CAL. Padronização da citologia de impressão da superfície ocular canina. *Arch Vet Sci.* 2005;10(1):109-15.
18. Singh R, Joseph A, Umopathy T, Tint NL, Dua HS. Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol.* 2005;89(12):1655-9.
19. Luzeau R, Carlier C, Ellrodt A, Amédée-Manesme O. Impression cytology with transfer: na easy method for detection of vitamin A deficiency. *Int J Vitam Nutr Res.* 1988;58(2):166-70.
20. Carlier C, Moulia-Pelat JP, Ceccon JF, Mourey MS, Fall M, N'Diaye M, et al. Prevalence of malnutrition and vitamin A deficiency in the Dioubel, Fatick, and Kaolack regions of Senegal: feasibility of the method of impression cytology with transfer. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(1):66-9.
21. Carlier C, Moulia-Pelat JP, Ceccon JF, Mourey MS, Malvy D, Fall M, et al. Prevalence of malnutrition and vitamin A deficiency in the Diourbel, Fatick, and Kaolack regions of Senegal: a controlled study. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(1):74-7.
22. Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH. *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat.* 2nd ed. St. Louis: Mosby Inc.; 1999.
23. Raskin RE, Meyer DJ. *Atlas de citologia de cães e gatos.* São Paulo: Roca; 2003.
24. Meinkoth JH, Cowell RL, Tyler RD, Morton RJ. Coleta e preparo de amostras. In: Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH, DeNicola DB. *Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos.* São Paulo: MedVet; 2009. p.1-19.
25. Association for Research in Vision and Ophthalmology. ARVO. Statement for the use of animals in ophthalmic and visual research. 2007 [cited 2007 Apr 10]. Available from: http://www.arvo.org/Policies/Statement_for_the_Use_of_Animals_in_Ophthalmic_and_Visual_Research/
26. Jörundsson E, Lumsden JH, Jacobs RM. Rapid staining techniques in cytopathology: a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, papanicolaou and romanowsky stains. *Vet Clin. Pathol.* 1999;28(3):100-8.
27. Gompel C, Koss LG. *Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas.* São Paulo: Manole; 1997.
28. Azevedo GM, Souza AP, Portela RA, Dantas ES, Silva RMN, Evêncio Neto J. Avaliação citológica da conjuntiva de cães clinicamente sadios pelo método panótico. *Rev Cient Med Vet - Medvep.* 2009;7(23):473-7.
29. Moore CP, Wilsman NJ, Nordheim EV, Majors LJ, Collier LL. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28(12):1925-32.

Recebido em: 16/02/12

Aceito em: 25/06/12

EFICIÊNCIA DO ACETATO DE DESLORELINA E DO EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM ÉGUAS

Cely Marini Melo¹
Frederico Ozanam Papa²
José Nicolau P. Puoli Filho³
Gustavo Henrique Araújo¹
José Antônio Dell'Aqua Jr¹
Marco Antonio Alvarenga⁴

RESUMO

A indução farmacológica da ovulação é um procedimento fundamental na maximização e sucesso dos diferentes protocolos com utilização do sêmen eqüino. Ela tem sido amplamente utilizada nas inseminações com sêmen transportado, congelado e na sincronização para transferência de embriões. O hormônio mais utilizado para este fim é o hCG, que quando utilizado em repedidas aplicações promove o desenvolvimento de anticorpos tornando-o ineficiente promotor da ovulação. Fármacos alternativos têm sido desenvolvidos com o intuito de substituir o hCG como indutor de ovulação e, ao mesmo tempo, minimizar efeitos indesejados como promotor de anticorpos. O acetato de desloreline e o extrato de pituitária eqüina (EPE) são alternativas para sincronizar o momento da ovulação, podendo ser utilizados em vários ciclos consecutivos, sem o inconveniente da formação de anticorpos. O presente estudo comparou a eficiência da administração do extrato de pituitária eqüina em diferentes concentrações e o acetato de desloreline na indução de ovulação em éguas. Foram utilizados 126 ciclos de 25 éguas, as quais tiveram as ovulações induzidas com 1 mg de acetato de desloreline (IM), 10 mg de EPE (EV) ou 5mg EPE (EV). Das éguas tratadas com acetato de desloreline (1mg), 6,9% (2/29) não responderam ao tratamento e foram retiradas da análise da hora média de detecção da ovulação. O tempo médio da ovulação nos grupos tratados com acetato de desloreline (1 mg), EPE 10 mg e EPE 5mg foram respectivamente, $38,89 \pm 7,38^a$ e $34,75 \pm 6,72^b$ e $37,54 \pm 3,05^b$ horas. Com base nos resultados é possível concluir que ambos os agentes indutores da ovulação sincronizam, com grande eficiência, o tempo de ovulação em até 48 horas, sendo possível utilizar uma dose mais baixa de EPE do que a citada na literatura.

Palavras-chave: égua, acetato de desloreline, extrato de pituitária eqüina, indução de ovulação

¹ Médica Veterinária, Pós-doutoranda do Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária – FMVZ-UNESP- Botucatu

² Médico Veterinário, Professor Titular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-UNESP) Botucatu/SP.

³ Médico Veterinário, Prof. Assistente Doutor do Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-UNESP) Botucatu/SP. Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP:18610-000, Botucatu/SP. Autor para correspondência: jnppf@fmvz.unesp.br

⁴ Médico Veterinário, Professor Adjunto do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-UNESP) Botucatu/SP. Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP:18610-000, Botucatu/SP. Autor para correspondência: malvarenga@fmvz.unesp.br

EFFICIENCY OF THE DESLORELIN ACETATE AND EQUINE PITUITARY EXTRACT ON INDUCTION OF OVULATION IN MARES

ABSTRACT

The induction of ovulation is a fundamental procedure to optimize the protocols of artificial insemination success. Ovulation inducing agents have been largely used in artificial inseminations using either cooled or frozen semen, and also to synchronize ovulation and embryo transfer, being hCG the most commonly used, however its efficacy is reduced when it is given repeatedly due to the development of antibodies. Alternative drugs have been developed to replace the hCG and also to reduce the anti-body production. Deslorelin and equine pituitary extract (EPE) can be used to synchronize the moment of ovulation. The present study compared the efficiency of different concentrations of equine pituitary extract and deslorelin to induce ovulation in mares. One hundred and twenty-six cycles from 25 mares were used. Ovulation was induced with 1mg of deslorelin (IM), 10mg of EPE (IV) or 5mg of EPE (IV). Two mares from 29 did not ovulate with deslorelin (6.9%) and were removed from the experiment. The mean ovulation intervals with deslorelin (1mg), EPE (10 and 5mg) were: 38.89 ± 7.38^a , 34.75 ± 6.72^b and 37.54 ± 3.05^b hours respectively. Based on results it is possible to conclude that both agents were efficient to induce ovulation until 48 hours, being possible to reduce the EPE's dose reported in the literature.

Keywords: mare, deslorelin acetate, equine pituitary extract, ovulation induction

LA EFICIENCIA DEL ACETATO DE DESLORELINA Y EL EXTRACTO DE PITUITARIA EQUINA EN LA INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN EN YEGUAS

RESUMEN

La inducción farmacológica de la ovulación es un procedimiento importante para la maximización y el éxito de los diferentes protocolos de uso del semen equino. Dicho procedimiento ha sido ampliamente utilizado para la inseminación con semen transportado, congelado y en la transferencia de embriones. La hormona más utilizada para este propósito es hCG, la cual, lleva a la producción de anticuerpos debido a su uso repetitivo, lo que la inutiliza como promotor de la ovulación. Han sido desarrollados fármacos alternativos con el objetivo de sustituir la hCG para inducir la ovulación y, al mismo tiempo, reducir los efectos no deseados como la producción de anticuerpos. El acetato de deslorelinina y el extracto de pituitaria equina (EPE) son alternativas para sincronizar la ovulación y puede ser utilizado en varios ciclos consecutivos, sin inducir la formación de anticuerpos. Este estudio comparó la eficacia de la administración de extracto de pituitaria equina en diferentes concentraciones y el acetato de deslorelinina para inducir la ovulación en yeguas. Fueron utilizados 126 ciclos, 25 yeguas, cuya ovulación fue inducida con 1 mg de acetato de deslorelinina (IM), 10 mg de EPE (EV) o 5mg EPE (EV). De las yeguas tratadas con acetato de deslorelinina (1mg), el 6,9% (2/29) no respondieron al tratamiento y fueron excluidas del análisis de tiempo medio para la detección de la ovulación. Los tiempos promedio de ovulación en los grupos tratados con acetato de deslorelinina (1 mg), 10 mg de EPE y 5mg EPE fueron, $38,89 \pm 7,38a$ y $34,75 \pm 6,72b$ y $37,54 \pm 3,05b$ horas, respectivamente. Con estos resultados podemos concluir que los agentes inductores de la ovulación funcionaron como sincronizadores eficaces en un periodo máximo de 48 horas y que se puede utilizar una dosis más baja de la EPE que aquella recomendada en la literatura.

Palabras clave: yegua, acetato de deslorelina, extracto de pituitaria equina, inducción de la ovulación.

INTRODUÇÃO

A alta variabilidade na duração do período do estro e a dificuldade em predizer o momento exato da ovulação levaram ao desenvolvimento de métodos para o controle do ciclo estral e da ovulação, especialmente para aumentar a performance reprodutiva tanto de garanhões como de éguas durante a estação de monta¹.

O emprego de indutores da ovulação contribui para a melhoria da eficiência reprodutiva, uma vez que viabiliza a redução do período de estro e sincroniza o momento das inseminações, as quais ocorrem num período de até 48 horas após a indução, reduzindo os gastos com o transporte de sêmen refrigerado e otimizando tanto as doses de sêmen congelado, bem como o uso do garanhão.

A maneira mais apropriada para predizer o momento de induzir a ovulação consiste na administração de agentes indutores quando um folículo de 33mm de diâmetro é detectado em éguas pôneis e um de 35mm em éguas, período em que o folículo encontra-se responsivo ao LH². Deste modo, após a indução da ovulação, a maioria das éguas ovularão no período correspondente a 36 e 48 horas da indução, demonstrando uma variação individual acentuada, a qual pode estar relacionada ao diâmetro ovulatório de cada animal³.

O hCG tem sido utilizado por muitos anos para diminuir o período de estro e acelerar a ovulação. Sua eficiência é amplamente demonstrada na indução da ovulação quando um folículo pré-ovulatório é detectado. A administração do hCG em éguas com um folículo pré-ovulatório de pelo menos 35mm é capaz de induzir a ovulação em até 48 horas em 80% dos casos⁴.

Apesar de ser um agente indutor de ovulação rotineiramente utilizado, o hCG apresenta a inconveniência de induzir a formação de anticorpos após injeções sucessivas⁵. Roser et al.⁶ encontraram que a formação de anticorpos se inicia após 2 a 5 injeções de hCG. Sullivan et al.⁷ observaram refratariedade ao hCG após a terceira aplicação.

A administração do GnRH sintético durante o estro estimula a liberação de LH e reduz a duração do estro⁸. O desenvolvimento de agonistas e análogos de GnRH aumentou a meia vida deste hormônio por modificações estruturais no GnRH natural, o que permitiu o aumento na concentração de LH por 12 a 24 horas após a aplicação dos mesmos⁴.

Samper et al.⁹ compararam o uso de hCG com um implante de acetato de deslorelina (Ovuplant – Pharmacia and UpJohn Co), nas doses de 2500UI e 2,2mg respectivamente. As éguas foram distribuídas aleatoriamente nos dois grupos e a ovulação foi induzida quando detectado edema uterino com escore entre 2 a 4. O intervalo entre a indução e a ovulação foi maior para as éguas que receberam hCG (28 a 96 horas) em relação às que receberam o acetato de deslorelina (36 a 42 horas). Deste modo, com a utilização da deslorelina é possível reduzir o número de coberturas, sendo de grande auxílio para os programas de transferência de embrião e inseminação artificial, especialmente para sêmen refrigerado e congelado.

Entretanto a utilização de implantes de acetato de deslorelina acarreta uma redução na secreção de FSH durante o período de diestro seguido da ovulação induzida por este agente. A redução da concentração de FSH pode ocasionar uma diminuição do diâmetro folicular, bem como atrasar a emergência de um folículo dominante, aumentando o período interovulatório¹⁰. Para que não ocorra interferência, se faz necessário a remoção do implante 48 horas após sua colocação¹¹, tornando pouco prático a utilização do mesmo.

De acordo com Fleury et al.¹² ao compararem as doses de 1,0; 1,5 e 2,0mg de acetato de deslorelina em veículo de liberação lenta (BioRelease Delivery System) observaram que 90%

das éguas ovularam em até 48 horas da indução da ovulação, sendo o tempo médio de ovulação para os referidos grupos: 44,4; 49,8 e 48,7, respectivamente.

O extrato de pituitária equina tem sido usado em diversos protocolos de superovulação em éguas¹³⁻¹⁸. Duchamp et al.⁵ mostraram que a dose de 50mg de EPE foi eficiente em induzir a ovulação em 86% das éguas, sendo que a dose de 25mg induziu a ovulação em 57% delas.

O extrato de pituitária equina ao contrário do hCG não induz a formação de anticorpos. Entretanto, deve-se levar em consideração a heterogeneidade das amostras de EPE².

O presente estudo comparou a eficiência da administração do extrato de pituitária equina em diferentes concentrações e o acetato de deslorelina na indução de ovulação em éguas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cento e vinte seis ciclos de 25 éguas, sendo 40 ciclos para o Extrato de Pituitária Equina (EPE) 10mg, 57 para EPE 5mg e 29 para 1 mg de acetato de deslorelina (BioRelease, BET Laboratories, Rio de Janeiro, Brasil). As éguas foram rufiadas diariamente e até a detecção do estro. Após a detecção do estro, as fêmeas foram examinadas diariamente por palpação trans-retal e ultra-sonografia, e as ovulações foram induzidas após a detecção de um folículo com 35 mm de diâmetro em associação à presença de edema uterino grau 3. Para a indução da ovulação, as éguas foram tratadas com 1 mg de acetato de deslorelina (BioRelease, BET Laboratories, Rio de Janeiro, Brasil) via intramuscular ou 10 mg de EPE endovenoso. As éguas foram examinadas por palpação e ultra-sonografia trans-retal 24 horas após as aplicações e, a partir deste momento, o monitoramento passou a ser realizado a cada seis horas até a confirmação da ovulação.

Análise estatística

Para análise estatística utilizou-se os teste ANOVA e de Tukey na avaliação dos intervalos ovulatórios após o momento da indução. Foram retiradas das análises os animais que ovularam em período superior a 48 horas após a indução da ovulação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média e o desvio padrão do momento de detecção da ovulação após a indução com acetato de 1 mg de deslorelina e 10 mg de EPE foram, respectivamente, $38,89 \pm 7,38^a$ e $34,75 \pm 6,72^b$ horas, com diferença entre esses valores ($P < 0,05$).

Os resultados das ovulações foram agrupados em cinco categorias de acordo com o momento da ovulação: 1) ovulações até 24 horas pós-aplicação, 2) de 24 a 36 horas, 3) 36 a 48 horas, 4) 48 a 60 horas e 5) mais que 60 horas. Os resultados estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem (%) de animais, por grupo, que ovularam em cada intervalo de exames ultra – sonográficos.

| | < 24h | 24 a 36h | 36 a 48h | 48 a 60h | > 60h |
|------------------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------|
| EPE 10 mg (n=40) | 7/40 17,5% ^a | 18/40 45% ^a | 14/40 35% ^b | 1/40 2,5% ^a | — |
| EPE 5 mg (n=57) | 2/57 3,5% ^a | 17/57 29,8% ^{ab} | 38/57 66,7% ^a | — | — |
| Deslorelina 1 mg (n=29) | 4/29 13,8% ^a | 3/29 10,3% ^b | 20/29 69% ^a | — | 2/29 6,9% |

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

Em 6,9% (2/29) dos ciclos tratados com o acetato de deslorelina não responderam ao tratamento, e foram retiradas da análise dos dados da hora média de detecção da ovulação. O tempo médio da ovulação nos grupos tratados com acetato de deslorelina e EPE foram, respectivamente, $38,89 \pm 7,38^a$ e $34,75 \pm 6,72^b$ horas, sendo observada diferença estatística entre esses valores (p<0,05).

Os achados obtidos no presente experimento estão de acordo com Samper et al.⁹, os quais constataram que ao utilizarem o acetato de deslorelina, as ovulações foram concentradas entre 36 a 42 horas da indução, demonstrando ser uma alternativa eficiente ao hCG. A utilização de 10 mg de EPE intravenoso concentrou o momento da ovulação entre 24 a 36 horas após a indução. Entretanto, a administração de 5mg de EPE induziu a maioria das ovulações no período compreendido entre 36 a 48 horas (66,6% das éguas). Duchamp et al.⁵ induziram a ovulação com a dose de 50mg de EPE em 86% das éguas, no período entre 24 e 48 horas da administração. O presente estudo obteve uma resposta semelhante com um quinto da dose (10mg de EPE), com 80% de ovulações concentradas no período de 24 a 48h.

A amplitude do intervalo entre a administração e a ovulação pode estar relacionada a uma variação individual na responsividade do folículo ao LH, a despeito da presença de folículos com diâmetro compatível com a indução da ovulação³. Entretanto, tanto o uso do EPE como da deslorelina concentraram as ovulações num período menor do que o descrito na literatura⁹ para o hCG (28 a 96 horas). Tal fato favorece a redução no número de visitas por parte do técnico aos haras para efetuar a palpação retal, sincroniza a doadora e a receptora, além de reduzir o número de inseminações, seja com sêmen fresco, refrigerado ou congelado.

Outra grande vantagem do emprego tanto do acetato de deslorelina, como do EPE na indução da ovulação é a não formação de anticorpos após repetidas administrações, como é o caso do hCG^{5,6}.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos conclui-se que ambos indutores da ovulação sincronizam com grande eficácia o tempo da ovulação. O EPE na dose de 10mg adianta em aproximadamente 4 horas o momento da ovulação em relação ao acetato de deslorelina. A utilização de 5mg do EPE demonstrou-se tão eficiente quanto à de 10mg na indução da ovulação.

AGRADECIMENTOS

BET Laboratories, pelo fornecimento do acetato de deslorelina (BioRelease) e a Schering-Plough pela doação da prostaglandina Ciosin[®].

REFERÊNCIAS

1. Veronesi MC, Battochio M, Faustini M, Gandini M, Cairoli F. Relationship between pharmacological induction of estrous and/or ovulation and twin pregnancy in the Thoroughbred mares. *Domest Anim Endocrinol*. 2003;25:133-40.
2. Palmer E. Induction of ovulation. In: McKinnon AO, Voss JL. *Equine reproduction*. Malvern: Lea & Febiger; 1993. p.344-7.
3. Samper JC. Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time ovulation in mares. In: *Proceedings of the 43rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*; 1997, Phoenix. Phoenix, Arizona: AAEP; 1997. p.189-91.
4. Bergfelt DR. Estrous synchronization. mare. In: *Equine breeding management and artificial insemination*. Philadelphia: Saunders; 2000. p.195-228.
5. Duchamp G, Bour B, Combarous Y, Palmer E. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J Reprod Fertil*. 1987;35 Suppl:221-8.
6. Roser JF, Kiefer BL, Evans JW, Neely DP, Pacheco CA. The development of antibodies to human chorionic gonadotrophin following its repeated injections in the cyclic mare. *J Reprod Fertil*. 1979;27 Suppl:173-9.
7. Sullivan JJ, Parker WG, Larson LL. Duration of estrus and ovulation time in non-lactating mares given human chorionic gonadotropin during three successive estrous periods. *J Am Vet Med Assoc*. 1973;162:895-8.
8. Irvine DS, Downey BR, Parker WG, Sullivan JJ. Duration of oestrus and time of ovulation in mares treated with synthetic GnRH (AY-24,031). *J Reprod Fertil*. 1975;23 Suppl:279-83.
9. Samper JC, Jensen S, Sergenat J. Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. *J Equine Vet Sci*. 2002;22:320-3.
10. McCue PM, Farquhar VJ, Squires EL. Effect of the GnRH agonist deslorelin acetate on pituitary function and follicular development in the mare. In: *Proceedings of the 46th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*; 2000, San Antonio. San Antonio, Texas: AAEP; 2000. p.355-6.
11. Farquhar VJ, McCue PM, Carnevale EM, Squires EL. Interovulatory intervals of embryo donor mares administered deslorelin acetate to induce ovulation. *Theriogenology*. 2001;55:362.
12. Fleury J, Fleury P, De Souza FA, Gilley R. Preliminary evaluation of a BioRelease delivery system for the controlled release of Deslorelin (Des) for advancing ovulation in the mare: effects of dose. *Rev Bras Reprod Anim*. 2003;27:501-2.
13. Douglas RH. Review of induction of suproovulation and embryo transfer in the equine. *Theriogenology*. 1979;11:33-46.

14. Douglas RH, Nuti L, Ginther OJ. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. *Theriogenology*. 1974;2:133-42.
15. Lapin DR, Ginther OJ. Introduction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with na equine extract. *J Anim Sci*. 1977;44:834-42.
16. Woods GL, Ginther OJ. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. *Theriogenology*. 1983;20:347-75.
17. Alvarenga MA, McCue P, Squires EL, Neves-Neto JR. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology*. 2001;56:879-87.
18. Alvarenga MA, McCue P, Squires EL, Neves-Neto JR. Improvement of ovarian superstimulation in mares treated with EPE twice daily. *Arq Fac Vet UFRGS*. 1999;27 Suppl:197.

Recebido em: 08/03/10

Aceito em: 29/06/12

UTILIZAÇÃO DO AGLEPRISTONE NO TRATAMENTO DA HIPERPLASIA FIBROEPITELIAL MAMÁRIA FELINA

Francis Brito da Silva¹
Alessandra Estrela da Silva Lima²
Lorena Gabriela Rocha Ribeiro³
João Moreira da Costa Neto⁴
Ana Carolina Farias Costa⁵
Camila Pinho Balthazar da Silveira⁶
Stella Barrouin Mello⁷
Daniela Farias Larangeira⁷
Arianne Pontes Oriá⁷

RESUMO

A hiperplasia mamária é uma alteração benigna da glândula mamária, caracterizada por um crescimento exacerbado do parênquima, após estímulo de substâncias progesteronais endógenas ou exógenas. Corresponde a uma mastopatia observada principalmente em fêmeas felinas jovens. Por se tratar de uma lesão extensa, nos últimos anos, terapias alternativas à mastectomia têm sido testadas, a exemplo dos fármacos antagonistas da progesterona. Neste contexto, o trabalho relatou oito casos de gatas portadoras de hiperplasia mamária e tratadas com o aglepristone. Com base nos resultados observados o protocolo utilizado demonstrou ser uma alternativa factível e segura para o tratamento da hiperplasia fibroepitelial mamária em felinos.

Palavras-chave: progesterona, antagonista, glândula mamária, *Felis catus*.

USE OF AGLEPRISTONE IN THE TREATMENT OF FELINE MAMMARY FIBROEPITHELIAL HYPERPLASIA

ABSTRACT

Mammary hyperplasia is a benign alteration of the mammary gland, characterized by an overgrowth of the parenchyma, after stimulation of endogenous or exogenous progestational substances. Corresponds to a mastopathy observed mostly in young female cat. As it is extensive lesion, in recent years, alternative therapies to mastectomy have been tested, like progesterone antagonist drugs. In this context, this paper reported eight cases of queens suffering from mammary hyperplasia and treated with aglepristone. Based on the results, the used protocol showed to be a feasible and safe treatment for feline mammary fibroepithelial hyperplasia.

Keywords: progesterone, antagonist, mammary gland, *Felis catus*.

¹ Residente em Clínica Médica de Pequenos Animais Hospmev/UFBA

² Professor(a) Departamento de Patologia e Clínicas da Universidade Federal da Bahia(UFBA)

³ Médica Veterinária, Mestre em Ciência Animal nos Trópicos (UFBA)

⁴ Professor(a) Departamento de Patologia e Clínicas da Universidade Federal da Bahia(UFBA)

⁵ Médica Veterinária, Mestre em Ciência Animal nos Trópicos (UFBA)

⁶ Residente em Cirurgia de Pequenos Animais Hospmev/UFBA

⁷ Professores do Departamento de Patologia e Clínicas da Universidade Federal da Bahia(UFBA)

USO DE AGLEPRISTONA EN EL TRATAMIENTO DE HIPERPLASIA FIBROEPITELIAL MAMARIA FELINA

RESUMEN

La hiperplasia mamaria es una alteración benigna de la glándula mamaria, que se caracteriza por el crecimiento excesivo del parénquima, después de la estimulación de sustancias progesteronales endógenas o exógenas y que se observa principalmente en gatas jóvenes. Por tratarse de una alteración extensa, en los últimos años han sido experimentados tratamientos alternativos, por ejemplo, los fármacos antagonistas de la progesterona. En este contexto, el trabajo reporta ocho casos de gatas con hiperplasia mamaria que fueron tratadas con aglepristona. Con base en los resultados observados, el protocolo utilizado demostró ser una alternativa viable y segura para el tratamiento de la hiperplasia fibroepitelial mamaria felina.

Palavras clave: antagonista, progesterona, glándula mamaria, *Felis catus*.

INTRODUÇÃO

A hiperplasia fibroepitelial mamária felina é um distúrbio do crescimento tecidual, de caráter benigno, que resulta no crescimento rápido, porém ordenado, tanto do parênquima quanto do estroma da glândula mamária (1). Ocorre principalmente em felinos, sendo mais frequente em fêmeas jovens, logo após o primeiro cio ou nas gestantes. Porém, também pode acometer animais de meia idade após uso de progestágenos exógenos (2-5). Aparentemente não há predisposição racial ou morfológica, sendo os pares torácicos e abdominais igualmente acometidos (6).

Sabe-se que existe uma relação temporal entre o estabelecimento da hiperplasia mamária e a estimulação pela progesterona, de forma que a exposição ao hormônio (endógeno ou exógeno) antecede sempre o aparecimento dos sintomas. O tempo médio de evolução é compreendido entre duas a cinco semanas. No entanto, no momento do diagnóstico as concentrações séricas hormonais podem apresentar-se dentro dos limites de normalidade (6).

Ao exame clínico, as glândulas afetadas mostram-se uniformes e intensamente aumentadas de volume, firmes, com bordas bem delimitadas da parede abdominal subjacente (3). Úlceras cutâneas podem ser observadas devido ao rápido crescimento tecidual ou, ainda, por lambeduras excessivas do local (4, 7). Histologicamente verifica-se proliferação do epitélio dos ductos e células mioepiteliais periglandulares, edema marcante e grande quantidade de tecido conjuntivo. Estão presentes ninhos de proliferação de ductos glandulares ramificados, cobertos por uma camada única de células cubóides com uma ou duas camadas apicais de células epiteliais colunares. Não há invasão do estroma por estas células, uma vez que se trata de condição benigna não neoplásica (2, 6, 7).

O diagnóstico é balizado no histórico e sinais clínicos da paciente, podendo ser confirmado pela citologia por punção com agulha fina (8) e pelo exame histopatológico. A terapêutica primária é a remoção do estímulo da progesterona. Portanto, nos casos de administração exógena do hormônio, esta deve ser interrompida imediatamente (9, 10). Quando a enfermidade é ocasionada de modo endógeno espera-se redução espontânea. Contudo a involução do volume mamário é lenta, podendo prolongar-se por meses até o retorno ao tamanho normal (11). O tratamento cirúrgico, pela técnica de mastectomia, foi por muito tempo preconizado, principalmente quando o crescimento anormal da glândula mamária superava a capacidade de seu aporte sanguíneo e torna o tecido necrótico (4). No entanto, em função da ampla extensão da lesão que requer um procedimento mais invasivo, o uso de antagonistas da progesterona (como o aglepristone), equivale a uma alternativa terapêutica da hiperplasia mamária felina e vem sendo motivo de estudos de diversos autores

(12-15). Em adição, a ovariosalpingohisterectomia (OSH) é preconizada, invariavelmente, após diminuição do volume mamário, como forma de evitar recorrências (16, 17).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho correspondeu em relatar a utilização do medicamento aglepristone no tratamento de oito casos de hiperplasia fibroepitelial mamária felina, atendidos em um Hospital Veterinário Universitário.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram atendidas oito gatas jovens (casos 1 a 8), com idades inferiores a 12 meses, portadoras de aumento exacerbado das glândulas mamárias e cujo tempo de evolução variou de 15 dias a dois meses. Em cinco casos, a alteração foi precedida por uso de contraceptivo, e em um deles (caso 8), informações relativas ao histórico clínico eram desconhecidas, uma vez que a paciente fora resgatada da rua. Conduziu-se a avaliação das pacientes no Hospital Veterinário Renato de Medeiros Neto, da Universidade Federal da Bahia (Hospmev/UFBA).

Todos os animais foram submetidos a exame clínico geral. Em seguida solicitaram-se alguns exames complementares (hemograma com contagem de plaquetas e dosagem sérica de alanina aminotransferase, gamaglutamil transferase, creatinina e uréia), destinados a avaliação do estado geral. Balizado no histórico e sinais clínicos apresentados, firmou-se o diagnóstico presuntivo de hiperplasia fibroepitelial mamária. Assim, instituiu-se a terapêutica com aglepristone⁸ em todas as pacientes, na dose de 10mg/Kg, via subcutânea (SC), a cada 24 horas, durante quatro dias consecutivos (12). Como tratamento de suporte, no intuito de fornecer maior conforto e controle da dor provocada pela patologia mamária, foram utilizados anti-inflamatórios não esteroidais (flunixin meglumine, 1mg/kg, SC, em três casos e meloxicam, 0,1mg/kg, SC, nos demais), durante três dias e aplicação de compressas mornas por dez minutos, duas vezes ao dia até a regressão das glândulas a seu tamanho normal. Em três pacientes (casos 3, 7 e 8) foi necessário estabelecer antibioticoterapia (amoxicilina com ácido clavulânico, 20mg/kg, via oral, a cada 12 horas, por 15 dias) em consequência da leucocitose por neutrofilia com desvio a esquerda observados no hemograma.

RESULTADOS

Ao exame físico, as alterações restringiam-se apenas ao aumento das glândulas mamárias (Figura 1). Em um caso (caso 8), a gata apresentava escore corporal ruim. Os dados do histórico e evolução do tratamento das pacientes encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Histórico clínico e evolução do tratamento com aglepristone de gatas portadoras de hiperplasia fibroepitelial mamária. Salvador-BA, 2010.

| Caso | Idade (meses) | Utilização de Contraceptivo | Tempo de evolução (dias) | Regressão (dias) | OSH | Recidiva |
|------|---------------|-----------------------------|--------------------------|------------------|----------------|----------|
| 1 | 8 | Sim | 30 | 30 | Após regressão | Não |
| 2 | 12 | Não | 30 | 15 | Após regressão | Não |
| 3 | 8 | Sim | 30 | 60* | Após recidiva | Sim |
| 4 | 11 | Sim | 45 | 30 | Após regressão | Não |
| 5 | 7 | Sim | 30 | 15 | Após regressão | Não |
| 6 | 6 | Sim | 15 | 30 | Após regressão | Não |
| 7 | 9 | Não | 60 | 21 | Não realizada | Não |
| 8 | 6 | Desconhecido | 15 | 21 | Após regressão | Não |

*Neste animal observou-se recidiva e a regressão da alteração ocorreu apenas após a realização da OSH.

⁸ Alizin, Virbac – São Paulo – SP



Figura 1. Apresentação clínica da hiperplasia fibroepitelial mamária felina. A e B: fêmea, SRD, 12 meses de idade (caso 2); C e D: fêmea, SRD, 06 meses de idade (caso 8). Em ambas as situações verificam-se aumento de volume exacerbado das glândulas mamárias. Salvador-BA, 2010.

DISCUSSÃO

Todos os animais atendidos no Hospmev/UFBA com suspeita de hiperplasia fibroepitelial mamária tinham idade inferior a doze meses. As características clínicas dos casos condiziam com os dados da literatura, com maior suscetibilidade em animais no início da idade reprodutiva, nas quais as lesões surgem geralmente duas a quatro semanas após o primeiro estro (5, 8). Esta é a apresentação clássica da mastopatia (2, 6, 8, 16). De acordo com alguns autores, a etiologia do processo está fortemente associada à ação da progesterona (7, 18). Tal relação é corroborada pelo fato da patologia mamária ocorrer com frequência durante a fase lútea do ciclo estral ou ainda em resposta à administração exógena do hormônio supracitado (19), sendo estes eventos observados desde a primeira descrição da enfermidade em questão (20).

Excetuando-se três animais (casos 2, 7 e 8), em todas as pacientes atendidas houve administração de anticoncepcionais previamente ao desenvolvimento da hiperplasia mamária, entretanto os proprietários não souberam determinar o princípio ativo utilizado. Tais achados foram similares aos descritos por Loretto et al. (21) que relataram a alteração em oito fêmeas que receberam uma única dose de acetato de medroxiprogesterona. No trabalho dos referidos autores houve crescimento mamário, entre dois dias a três meses após a administração do

fármaco. O uso de progesterona exógena em cães e gatos estimula a síntese de hormônio do crescimento na glândula mamária com proliferação lóbulo-alveolar e consequente hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios, que pode induzir a formação de alterações benignas em animais jovens (22).

Em gatas sem histórico de exposição a progestágenos sintéticos, a hiperplasia fibroepitelial mamária provavelmente resulta de mudanças na sensibilidade ou resposta a concentrações variáveis de hormônios ovarianos (6, 18). Desta forma, as gatas dos casos 2 e 7 representaram uma ocorrência espontânea de hiperplasia fibroepitelial. No caso 8, não foi possível afirmar a fonte de exposição, uma vez que se trata de um animal de rua.

Ao exame físico, todas as gatas possuíam aumento bilateral acentuado das glândulas mamárias, as quais se encontravam firmes e sensíveis à palpação. De acordo com alguns estudos, as gatas jovens exibem mais frequentemente envolvimento de múltiplas mamas, enquanto as mais velhas costumam ter aumento apenas em uma ou duas glândulas, sendo geralmente as inguinais (16). Em outra pesquisa, as fêmeas felinas avaliadas tinham mamas de consistência macia e flutuante (23), o que diferiu do presente relato, cuja consistência das glândulas era mais firme, provavelmente em função da significativa resposta inflamatória associada.

Em todas as gatas examinadas, a queixa principal se restringiu ao aumento de volume das glândulas mamárias, não sendo evidenciada na análise física outra alteração clínica, com exceção do caso 8 que revelou escore corporal ruim. Gatas com hiperplasia fibroepitelial mamária normalmente não demonstram outras anormalidades associadas. Entretanto pode haver desconforto e dificuldade de locomoção em lesões extensas (16), apatia, anorexia e trombo venoso mamário, com possível êmbolo arterial pulmonar (11). Em situações com presença de amplas áreas de necrose no tecido mamário (e consequente hemorragia), podem ser evidenciados anemia ou até mesmo choque hipovolêmico (11, 14). No presente estudo foi diagnosticado leucocitose com neutrofilia e desvio à esquerda nas gatas dos casos 3, 7 e 8, as quais receberam antibioticoterapia. Tal fato tornou-se importante, uma vez que felinos com hiperplasia fibroepitelial mamária podem desenvolver mastite secundária, sendo assim indicada a utilização de antibiótico de amplo espectro (11).

O diagnóstico definitivo é firmado pela citologia aspirativa por agulha fina ou exame histopatológico, principalmente em casos atípicos ou em estágios iniciais da doença (5, 16). No entanto, no presente caso, o diagnóstico foi estabelecido de maneira presuntiva, fundamentado no histórico juntamente aos sinais clínicos, como realizado em diversos estudos (12, 13, 15). Não foram executadas dosagens de progesterona sérica, pois esse método é pouco sensível, e já se detectou que apenas 1/3 dos animais afetados apresentam concentrações elevadas deste hormônio (6, 8).

Em todos os casos, indicou-se a terapia primária com o aglepristone (antagonista de receptores de progestágeno) segundo protocolo descrito por Wehrend et al. (12). Outro trabalho testou o aglepristone em 22 felinos com administração de 20mg/kg, semanalmente, até a regressão das glândulas para o volume normal, com semelhante sucesso. Todavia, foi necessário maior tempo para remissão completa das lesões (13). Outro regime de aplicação relatado obteve a redução completa somente após a sexta semana, com infusão do antagonista nos dias 1, 2, 7, 14 e 21 (14).

Das oito gatas tratadas com aglepristone, sete mostraram regressão satisfatória, sem recidivas (Figura 2). A paciente do caso 3, inicialmente respondeu bem a terapia medicamentosa, com diminuição moderada das glândulas afetadas, porém foi detectada recorrência após 20 dias da última administração do antiprogestágeno. Nesta situação optou-se pela realização da OSH com abordagem pelo flanco. O acesso nesta área é preferível à celiotomia, uma vez que há dificuldade de incisão devido ao tecido mamário hiperplásico, além do aumento do risco de infecção e deiscência da ferida cirúrgica (24). Após o procedimento cirúrgico acima descrito, as glândulas mamárias da fêmea do caso 3 envolveram

paulatinamente, e retornaram ao tamanho normal em aproximadamente dois meses. Com base nestas características de evolução aventou-se a possibilidade do estímulo ter ocorrido pela progesterona endógena, uma vez que houve resposta inicial ao aglepristone, porém a remissão completa só foi factível após OSH.



Figura 2. Pacientes com diagnóstico presuntivo de hiperplasia fibroepitelial mamária e tratadas com aglepristone. A e B: fêmea, SRD, 12 meses de idade (caso 2); C e D: fêmea, SRD, 06 meses de idade (caso 8). Notar o aspecto normal das cadeias mamárias após três semanas da última administração do fármaco. Salvador-BA, 2010.

Uma atenção especial deve ser destinada aos animais que foram submetidos ao uso de progestágenos de depósito. Estes possuem efeito prolongado, podendo causar um segundo estímulo nos receptores de progesterona, desencadeando assim recidiva dos sinais clínicos (13, 21, 23). Quando a alteração mamária for estimulada por este tipo de medicamento, recomenda-se uma nova série de aplicação do aglepristone, pois o mesmo apenas bloqueia (e não inativa) os receptores de progesterona, o que poderá predispor a recorrências (13). Além do tratamento com o antiprogestágeno, a terapia de suporte com anti-inflamatórios não

esteróides e uso de compressas mornas foram consignadas em todos os casos, semelhante aos dados da literatura (16).

CONCLUSÃO

Relatos de hiperplasia fibroepitelial mamária felina tornam-se cada vez mais frequentes, possivelmente pelo uso indiscriminado de progestágenos como contraceptivo. O aglepristone na dose utilizada neste trabalho mostrou-se uma alternativa factível e segura para o tratamento de tal enfermidade mamária. Contudo, a administração de progestágenos de depósito pode ser um obstáculo para uma terapêutica exitosa.

REFERÊNCIAS

1. Hayden DW, Johnson KH, Ghobrial HK. Ultrastructure of feline mammary hypertrophy. *Vet Pathol.* 1983;20(3):254-64.
2. Souza TM, Figuera RA, Langohr IM, Barros CSL. Hiperplasia fibroepitelial mamária em felinos: cinco casos. *Cienc Rural.* 2002;32(5):891-4.
3. Silva AP, Salbego FZ, Palma HE, Amaral AS, Schmidt C, Silva CF. Hiperplasia fibroepitelial em uma gata. In: *Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 2008, Gramado. Gramado: Expogramado; 2008.*
4. Johnson CA. Distúrbios do sistema reprodutivo. In: Nelson RW, Couto CG. *Medicina interna de pequenos animais.* 4a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p 944-9.
5. Gaviria EFB, Bonikka DFE, Gómez AFL. Hiperplasia fibroepitelial mamaria felina: reporte de un caso. *Rev Ces Med Vet Zootec.* 2010;5(1):70-6.
6. Hayden DW, Johnston SD, Kiang DT, Johnson KH, Barnes DM. Feline mammary hypertrophy/fibroadenoma complex: clinical and hormonal aspects. *Am J Vet Res.* 1981;42(10):1699-703.
7. Martín de las Mulas J, Millán Y, Bautista MJ, Pérez J, Carrasco L. Oestrogen and progesterone receptors in feline fibroadenomatous change: an immunohistochemical study. *Res Vet Sci.* 2000;68(1):15-21.
8. Norsworthy GD. Hiperplasia mamária. In: Norsworthy GD, Crystal MA, Grace SF, Tilley LP. *O paciente felino.* 2ª ed. São Paulo: Manole; 2004. p.398-400.
9. Pukay BP, Stevenson DA. Mammary hypertrophy in a ovariohysterectomized cat. *Can Vet J.* 1983;24(5):143-4.
10. Macdougall LD. Mammary fibroadenomatous hyperplasia in a young cat attributed to treatment with megestrol acetate. *Can Vet J.* 2003;44(3):227-9.
11. Chisholm HC. Massive mammary enlargement in a cat. *Can Vet J.* 1993;34(3):315.
12. Wehrend A, Hospes R, Gruber AD. Treatment of feline mammary fibroadenomatous hyperplasia with progesterone antagonist. *Vet Rec.* 2001;148(11):346-7.

13. Gorlinger S, Kooistra HS, Van de Broek A, Okkens AC. Treatment of fibroadenomatous hyperplasia in cats with aglepristone. *J Vet Intern Med.* 2002;16(6):710-3.
14. Vitásek R, Dendisova H. Treatment of feline mammary fibroepithelial hyperplasia following a single injection of proligestone. *Acta Vet Brno.* 2006;75(2):295-7.
15. Filgueira KD, Reis PFCC, Paula VV. Hiperplasia mamária felina: sucesso terapêutico com uso do aglepristone. *Cienc Anim Bras.* 2008;9(4):1010-6.
16. Vasconcellos CHC. Hiperplasia mamária. In: Souza HJM. *Coletâneas em medicina e cirurgia felina.* Rio de Janeiro: LF Livros; 2003. p.231-7.
17. Amorim FA. Hiperplasia mamária felina. *Acta Sci Vet.* 2007;35(Supl 2):279-80.
18. Enginler SO, Senünver A. The Effects of progesterone hormone applications used for suppression of estrus on mammary glands in queens. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2011;17(2):277-84.
19. McCaw DL. Moléstias da glândula mamária. In: Bojrab MJ. *Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais.* 3a ed. São Paulo: Manole; 1996. p.216-9.
20. Allen HL. Feline mammary hypertrophy. *Vet Pathol.* 1973;10(6):501-8.
21. Loretto AP, Ilha MRS, Ordás J, Martín de las Mulas J. Clinical, pathological and immunohistochemical study of feline mammary fibroepithelial hyperplasia following a single injection of depot medroxyprogesterone acetate. *J Feline Med Surg.* 2005;7(1):43-52.
22. Mol JA, Van Garderen E, Rutteman GR, Rijnberk A. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996;57(1-2):67-71.
23. Loretto AP, Ilha MRS, Breitsameter I, Faraco CS. Clinical and pathological study of feline mammary fibroadenomatous change associated with depotmedroxyprogesterone acetate therapy. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2004;56(2):270-4.
24. Minguez RE, Martinez-Darve JG, Cuest AMM. Ovariohisterectomia de gatas e cadelas pelo flanco. *Rev Bras Reprod Anim.* 2005;29(3-4):151-8.

Recebido em: 05/03/12

Aceito em: 10/07/12

EXAME ULTRASSONOGRÁFICO DA ARTICULAÇÃO METACARPOFALANGEANA DE EQUINOS PRATICANTES DE POLO NA ZONA OESTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO: PROTOCOLO E MENSURAÇÕES

Kate Moura da Costa Barcelos¹
Anna Paula Balesdent Barreira²
Fabiana Batalha Knackfuss³
Gabriela de Vasconcelos Costa Lobato⁴
Tatiana Noronha Gonçalves Rodrigues⁵
Márcia Carolina Salomão Santos⁶
Daniel Augusto Barroso Lessa⁷

RESUMO

A evolução da tecnologia vem ampliando a sensibilidade dos métodos de diagnóstico por imagem, especialmente da ultrassonografia. Os transdutores oferecem maior frequência e por consequência, a imagem possui melhor resolução. Com isso, é possível analisar estruturas não antes detalhadas, gerando a necessidade de constante atualização do conhecimento sobre seu padrão de normalidade. O objetivo deste trabalho foi detalhar o exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana de equinos de Polo e obter valores de referência para o padrão fisiológico das estruturas de tecidos moles da região. Para isso, foram examinados os boletos dos membros torácicos de 18 equinos adultos, de ambos os sexos, pesando entre 350 e 480 Kg e de idade de quatro a 12 anos. Todos eram praticantes regulares de Polo e não apresentavam claudicação, nem sinais de lesão do sistema locomotor ao exame físico. As principais estruturas de tecido mole foram examinadas e os resultados obtidos para área em corte transversal foram: TFDS - 1,23cm²; TFDP - 1,58 cm²; TEDC - 0,48 cm²; L SUS-RL - 1,16 cm²; L SUS-RM - 1,26 cm²; L SES R - 0,65 cm²; L SES OM - 0,29 cm²; L SES OL - 0,26 cm². Já no corte longitudinal foram encontrados os seguintes resultados: LAP - 0,40cm; CA - 0,84cm; Vilo - 0,62cm; L COL-M - 0,46cm; LCOL-L-0,44cm; BFS - 0,78cm. Os dados foram confrontados com os divulgados na literatura, onde semelhanças foram encontradas em estudos com animais de hipismo, no entanto ocorreram discrepâncias como a diferença em relação à espessura do Vilo. Outro fato observado foi relativo às estruturas pares que apresentaram os ramos mediais sempre um pouco maiores que os laterais. Conclui-se então que é necessário aprofundar-se no conhecimento do padrão fisiológico de estruturas articulares e perceber as diferenças entre as diferentes populações equinas. Só assim, será possível uma correta elaboração do exame ultrassonográfico articular e sua interpretação clínica.

Palavras-chave: articulação, metacarpofalangeana, equino, ultrassonografia, polo

¹ Msc. MV. – katebar@terra.com.br, Técnica da ABCCMM e ABCCB. Profa. Produção Animal e Equideocultura do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, RJ.

² Profa.Dra.Diagnóstico por Imagem/ Curso de Medicina Veterinária, Universidade Castelo Branco – UCB, RJ;

³ Profa.Bioestatística/ Curso de Medicina Veterinária, Universidade Castelo Branco – UCB, RJ;

⁴ MV, discente do curso de Pós-graduação em Clínica e Reprodução Animal da Universidade Federal Fluminense, UFF, RJ;

⁵ Msc.MV. Exército Brasileiro, Segundo Regimento de Cavalaria e Guardas Andrade Neves, RJ;

⁶ Profa. Dra. Radiologia Veterinária/ Faculdade de Veterinária/ UFF, RJ;

⁷ Prof. Dr. Clínica Médica de Grandes Animais/ Faculdade de Veterinária/ UFF, RJ.

ULTRASONOGRAPHY OF THE METACARPOPHALANGEAL JOINT OF POLO HORSES OF THE WEST OF THE STATE OF RIO DE JANEIRO: SCANING PROTOCOL AND MEASUREMENTS

ABSTRACT

The evolution of technology has increased the sensitivity of diagnostic imaging, especially in ultrasonography. The transducers can provide greater frequency and therefore the image has better resolution. This makes it possible to analyze structures that weren't detailed before, generating the need for constant updating of knowledge about their normal standard. This study aims to detail the ultrasound examination of the metacarpophalangeal joint of Polo horses and get reference values for the physiological pattern of soft tissue structures in the region. For this, were examined the forelimbs of 18 adult horses, male and female, weighing 350 to 480 kg and age of four to 12 years. The horses were all regular practitioners of Polo and had no complaint of lameness or other signs of injury to the locomotor system. Structures that are often studied as the superficial digital flexor tendon (SDFT) and deep digital flexor tendon (TFDP) were examined, as the structures of less attention in the literature as the joint capsule (CA), its dorsal fold (Vilo or Villus) and the collateral ligaments. The cross-sectional area were SDFT - 1.23 cm²; TFDP - 1.58 cm²; TEDC - 0.48 cm²; L SUS-RL - 1.16 cm²; SUS L-RM - 1.26 cm²; SES R L - 0.65 cm²; L SES OM - 0.29 cm²; SES L OL - 0.26 cm². In the longitudinal data we found the following: LAP 0, 40cm, CA - 0.84 cm; Vilo - 0.62 cm, L COL-M - 0.46 cm; LCOL-L - 0.44 cm; BFS - 0.78 cm. Data were compared with those published in the literature, where similarities were found in studies with jumping horses. But there were found discrepancies as the difference in thickness of the villus. Another factor was related with structures pairs, that showed the medial branches always a little larger than the lateral branches. On based on this, we concluded that it is necessary to study the physiological pattern of joint structures of different types of equestrian activities and understand the differences between them. Only then can it be done a reliable ultrasound scan and as well as its clinical interpretation.

Keywords: joint, metacarpophalangeal, equine, ultrasound, polo

ECOGRAFÍA DE LA ARTICULACIÓN METACARPOFALÁNGICA DE CABALLOS DE POLO EN EL OESTE DEL ESTADO DE RIO DE JANEIRO: PROTOCOLO Y MEDIDAS

RESUMEN

La evolución de la tecnología ha aumentado la sensibilidad del diagnóstico por imagen, especialmente de la ecografía. Los transductores proporcionan una mayor frecuencia y por lo tanto, la imagen tiene una mejor resolución. Esto posibilita el análisis de estructuras no descritas previamente en detalle, generando la necesidad de una constante actualización de conocimientos acerca de su normalidad. El objetivo de este estudio fue conocer los detalles de la ecografía de la articulación metacarpofalángica de caballos de Polo y obtener valores de referencia para el patrón fisiológico de las estructuras de los tejidos blandos de la región. Para ello, se analizaron los menudillos de los miembros torácicos de 18 caballos adultos de ambos sexos, con un peso entre 350 y 480 kg y con edades de cuatro a 12 años. Todos ellos eran utilizados regularmente en pruebas de Polo y no presentaban claudicación u otros signos de lesión del aparato locomotor. Fueron analizadas las principales estructuras de tejidos blandos incluyendo el tendón flexor digital superficial (TFDS) y el tendón flexor digital profundo (TFDP), así como estructuras menos citadas en la literatura como la cápsula articular (CA), su

seno dorsal (Vilo) y los ligamentos colaterales. Los resultados obtenidos para los cortes transversales fueron: TFDS - 1,23 cm²; TFDP - 1,58 cm²; TEDC - 0,48 cm²; SUS L-RL - 1,16 cm²; SUS L-RM - 1,26 cm²; SES R L - 0,65 cm²; L SES OM - 0,29 cm²; L SES OL - 0,26 cm². En los datos longitudinales encontramos lo siguiente: LAP 0,40 cm, CA - 0,84 cm; Vilo - 0,62 cm, L COL-M - 0,46 cm; LCOL-L - 0,44 cm; BFS - 0,78 cm. Los datos se compararon con aquellos publicados en la literatura y se encontraron similitudes con los estudios realizados en caballos de salto. Sin embargo, también hubo discrepancia como la diferencia en relación a la espesura del vilo. Las estructuras pares presentaron ramos mediales siempre un poco más grandes que los laterales. Así, se concluyó que es necesario profundizar el conocimiento del patrón fisiológico de las estructuras articulares y percibir las diferencias entre las poblaciones de equinos. Sólo entonces será posible la correcta elaboración de la ecografía articular y su interpretación clínica

Palabras claves: articulación, ecografía, metacarpofalángica, equino, polo

INTRODUÇÃO

Lesões músculo-esqueléticas possuem alta incidência em diversos países, resultando em problemas no manejo de equinos atletas (1). Em 1985, Rosedale et al. (2) realizaram pesquisa em cavalos de corrida na Inglaterra e observaram que as lesões do sistema locomotor respondem por 68% dos afastamentos das pistas, enquanto que os problemas respiratórios respondem por apenas 22%.

As injúrias tendíneas e ligamentares da região metacarpiana e da quartela são comuns (3), por isto o exame destas regiões é bem conhecido. No entanto, há carência de publicações nacionais sobre o exame detalhado das articulações, sobretudo da articulação metacarpofalangeana ou boleto. Esta região sofre grande estresse biomecânico durante a locomoção, sobretudo em competições. Neste momento, movimentos extremos como hiperextensão, rolamento e hiperflexão causam intensa tensão sobre os tecidos moles de sustentação do boleto, podendo incorrer na instalação da injúria (4).

As técnicas de diagnóstico por imagem são essenciais para a realização da avaliação completa das articulações, já que são formadas por ossos, cartilagens e diferentes estruturas de tecido mole. Na análise articular, a radiologia fornece boa avaliação óssea, mas deve ser complementada pela ultrassonografia, que possui maior sensibilidade para alterações de tecido mole. Para Denoix e Agrécé (5), esta técnica fornece valiosas informações diagnósticas, mesmo em indivíduo sem alterações radiográficas. Possibilita a quantificação da extensão da lesão (6), bem como sua detecção precoce (7, 8).

A ultrassonografia é uma técnica operador-dependente e para realização de exame confiável, é necessário amplo aprendizado sobre anatomia sonográfica e variações individuais (8). Caso realizada ou interpretada de forma inadequada, segundo Genovese e Rantanen (9), pode resultar no agravamento de lesões, no comprometimento do desempenho ou até na aposentadoria precoce.

Embora a avaliação ultrassonográfica das estruturas articulares ainda não seja rotineira no Brasil, Denoix et al. (4) relataram que a técnica possui boa acurácia na análise das estruturas de tecidos moles, mesmo pequenas, desde que utilizado um equipamento com boa resolução. É ainda, que o boleteo, apesar de possuir mais de dez destas estruturas, é considerada articulação ideal para o treinamento de iniciantes.

Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi descrever a metodologia do exame ultrassonográfico da articulação do boleteo de equinos normais, divulgar as janelas sonográficas e a mensuração de cada estrutura visível.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinados os boletos dos membros torácicos de 18 equinos adultos, machos e fêmeas, pesando de 350 a 480 Kg e de idade entre quatro e 12 anos. Todos eram praticantes regulares de Polo, na zona oeste do estado do Rio de Janeiro e não possuíam reclamação de claudicação ou demais sinais de lesão do sistema locomotor.

Foi usado equipamento de ultrassonografia⁸ portátil, com transdutor linear de 7,5 MHz e afastador de superfície (*stand-off*) próprio. O registro dessas imagens foi obtido por meio de impressora térmica⁹ e posteriormente analisado.

Para a realização do exame foi feita tricotomia, seguida de aplicação de gel em base aquosa¹⁰ e varredura em diferentes janelas acústicas, a serem descritas a seguir. A localização dos cortes sonográficos seguiu como referência a distância em centímetros, do osso Carpo Acessório (Doca), conforme metodologia descrita por Pugh (10).

As estruturas visualizadas encontram-se relacionadas na Figura 1. As de maior volume,



Figura 2. Exame ultrassonográfico da face palmar da articulação metacarpofalangiana. Esq. corte transversal, Dir: corte longitudinal.

ESTRUTURAS AVALIADAS

- (1) tendão flexor digital superficial (TFDS),
- (2) tendão flexor digital profundo (TFDP),
- (3) tendão extensor digital comum (TEDC),
- (4) ligamento anular palmar (LAP),
- (5) ligamento suspensor do boleteo - ramo medial (LSUS RM),
- (6) ligamento suspensor do boleteo - ramo lateral (LSUS RL),
- (7) cápsula articular (CA),
- (8) plica dorsal da cápsula (Vilo),
- (9) ligamento sesamoideo reto (LSES-R),
- (10) ligamento sesamoideo oblíquo medial (LSES-OM),
- (11) ligamento sesamoideo oblíquo lateral (LSES-OL),
- (12) ligamento colateral medial (LCOL-M),
- (13) ligamento colateral lateral (LCOL-L),
- (14) bainha flexora (BFSD).

Figura 1. Relação das estruturas avaliadas durante o exame ultrassonográfico dos boletos equinos.

tais como TFDS, TFDP, TEDC, L SUS e L SES foram analisadas em corte transversal (CT) e longitudinal (CL). As de menor volume (LAP, CA, Vilo, L COL e BFSD) foram analisadas apenas em CL.

Embora tenham sido avaliados área, espessura, padrão ecóico, ecotextura e alinhamento de fibras, apenas os dois primeiros foram analisados estatisticamente.

A varredura do TFDS, do TFDP e do LAPP foi realizada com posicionamento palmar da região do boleteo (Figura 2), de acordo com protocolo padrão.

Para avaliação dos ramos do L SUS, foi usada a janela acústica lateral e medial

⁸ GE Logic α 100

⁹ Sony, modelo 890

¹⁰ Carbogel®

(Figura 3), onde foi dispensada atenção especial à região da inserção do ligamento na face abaxial dos ossos sesamóides, medial e lateral. Nestas mesmas janelas, foram analisados os L COL L e M, que possuem um ramo na posição dorsopalmar e outro diagonal e próximo distal, como apresentado na Figura 3.



Figura 3. Janela sonográfica utilizada na varredura do ramo medial do ligamento suspensor do boleto (esq.), ligamento colateral lateral – ramo dorsopalmar (meio) e ramo diagonal (dir.).

Ainda para avaliar o TEDC, a cápsula articular e seu vilo, o transdutor foi posicionado em janela cranial, como demonstrado na Figura 4.

Após avaliação das estruturas proximais ao boleto, foram analisadas as distais, entre elas os L SES, que se localizam na face palmar da quartela. A varredura da região proximal dos ligamentos sesamoideos oblíquos requer uma inclinação proximal do transdutor, como apresentado na Figura 5.



Figura 5: Janela sonográfica utilizada para a análise dos ligamentos sesamoideos.

Após os dados terem sido tabulados, foi realizada a estatística

descritiva, sendo calculada média, variância, desvio-padrão e

coeficiente de variação das áreas ou das espessuras das estruturas. A fim de verificar se havia diferença estatística significativa entre as médias, foi realizado o teste t de Student, sendo considerado 5% de significância.



Figura 4. Janela sonográfica cranial, que permite a análise do TEDC, da cápsula e de sua plica sinovial(vilo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos na análise das estruturas estão representados nas Figuras 6 e 7, onde foi possível observar que não houve diferença estatística significativa, apontada pelo teste t de Student, entre as áreas ou espessuras das estruturas ($p > 0,05$), exceto no caso da bainha flexora sinovial digital. Ou seja, as estruturas de animais do mesmo porte variam pouco entre os indivíduos, o que não é verdadeiro para a BFS. Esta maior variação pode estar relacionada

com a proximidade do exame e o momento do exercício intenso, já que, segundo Reef (6), a produção de líquido sinovial responde positivamente à demanda biomecânica da região.

| Estrutura/ área (cm ²) | TFDS | TFD P | TEDC | L SUS- RL | L SUS- RM | L SES R | L SES OM | L SES OL |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-----------|-----------|---------|----------|----------|
| Média | 1,23 | 1,58 | 0,48 | 1,16 | 1,26 | 0,65 | 0,29 | 0,26 |
| Variância | 0,08 | 0,04 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,02 | 0,005 | 0,01 |
| Desvio | 0,28 | 0,21 | 0,13 | 0,19 | 0,20 | 0,11 | 0,07 | 0,1 |
| Coef. de variação | 23,03 | 13,4 | 28,01 | 16,33 | 15,94 | 17,77 | 26,74 | 39,83 |
| Teste t* | 0,39 | 0,48 | 0,48 | 0,32 | 0,58 | 0,45 | 0,92 | 0,77 |

Figura 6. Média da área das estruturas avaliadas em corte transversal nos membros torácicos direito e esquerdo. TFDS: tendão flexor digital superficial; TFDP: tendão flexor digital profundo; TEDC: tendão extensor digital comum; L SUS RM: ramo medial do ligamento suspensor do boleto; L SUS RL: ramo lateral do ligamento suspensor do boleto; L SES R: ligamento sesamoideo reto; L SES OM: ligamento sesamoideo oblíquo medial e L SES OL: ligamento sesamoideo oblíquo lateral. * p > 0,05

| Estrutura/ espessura (cm) | LAP | CA | Vilo | L COL-M | L COL-L | BFS |
|---------------------------|-------|------|-------|---------|---------|-------|
| Média | 0,40 | 0,84 | 0,62 | 0,46 | 0,44 | 0,78 |
| Variância | 0,01 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,04 |
| Desvio | 0,08 | 0,21 | 0,135 | 0,09 | 0,12 | 0,17 |
| Coef. de variação | 20,82 | 23,7 | 21,78 | 20,08 | 28,41 | 22,89 |
| Teste t* | 0,70 | 1 | 0,62 | 0,28 | 0,18 | 0,05 |

Figura 7. Valor médio da espessura das estruturas avaliadas em corte longitudinal nos membros torácicos direito e esquerdo. LAP: ligamento anular palmar; CA: cápsula articular; Vilo: plica dorsal; L COL M: ligamento colateral medial e L COL L: ligamento colateral lateral. * p > 0,05

A área média encontrada neste estudo para o TFDS foi de 1,23 cm², o que corrobora com os resultados obtidos por Gillis et al. (11), que consideraram valores de até 1,27 cm² como fisiológicos. Já a média encontrada para o TFDP de 1,58 cm² foi bastante inferior ao divulgado pelos mesmos autores, que consideraram fisiológicos valores de até 2,04 cm². Ainda para estas estruturas, os resultados do atual estudo em cavalos de Polo apresentaram semelhança com os dados de Pasin et al. (12) para cavalos de hipismo e diferentes dos encontrados em Árabes e Crioulos no mesmo estudo. Enquanto os animais de hipismo revelaram nesta região valores de TFDS e TFDP (1,19 e 1,50 cm²), os Árabes demonstraram (1,11 e 1,43cm²) e os Crioulos (1,11 e 1,33 cm²). As semelhanças e diferenças entre as estruturas parecem estar associadas ao porte dos animais.

As médias das áreas das inserções dos ramos do ligamento suspensor do boleto demonstraram diferença entre as faces dos membros, sendo o ramo medial (1,26 cm²) maior que o lateral (1,16 cm²), mas ambas próximas do padrão de normalidade de 1,2 cm² divulgado por Reef (6). A mesma observação pode ser feita para os ligamentos sesamoideos oblíquos, onde a área média do ramo medial (0,29cm²) supera discretamente a área do lateral (0,26cm²) e até para os ligamentos colaterais, sendo a espessura do medial (0,46 cm) e do lateral (0,44 cm). Esta diferença pode estar associada à dinâmica do jogo de Polo, onde o animal, ao ter seu centro de gravidade deslocado lateralmente pelo cavaleiro no ato de taquear a bola, suscita o fortalecimento das estruturas mediais. Esta suspeita necessita entretanto de comprovação científica.

A espessura média do ligamento anular encontrada (0,40 cm) foi maior que aquela divulgada por Sander et al. (13), de 0,30 cm. Estas pequenas diferenças podem estar relacionadas com o porte do animal, bem como o estresse que as estruturas são submetidas, de acordo com a atividade que os equinos desempenham. No Polo, a dinâmica do jogo propicia paradas e arrancadas rápidas e bruscas, o que poderia sobrecarregar esta estrutura e levar ao seu fortalecimento, o que justificaria a maior espessura.

Segundo Reef et al. (14), a espessura da cápsula articular varia na direção próximo-distal, o que não foi verificado neste estudo, uma vez que foi realizada apenas uma mensuração na altura da face articular. No entanto, a espessura média obtida na mensuração da cápsula (0,84 cm) encontra-se dentro dos padrões divulgados pela autora, entre 0,80 e 1,10 cm, mas ela afirma que na região de mensuração da plica sinovial (vilo), são esperados mais 0,20 cm de espessura, além do valor da cápsula. Esta informação conflita com o valor médio encontrado para a espessura da plica sinovial, que no atual trabalho revelou espessura média de 0,62 cm, ou seja, valor menor do que a média obtida somente na espessura da cápsula. Esta dissonância pode estar relacionada com a metodologia do exame realizado, e quanto à altura do corte de cada estrutura mensurada. Futuros estudos devem ser realizados com o objetivo de verificar o motivo desta discrepância.

A bainha flexora sinovial digital é melhor examinada na região proximal ao ligamento anular, a qual revelou espessura média de 0,78 cm, mas de acordo com Whitcomb (15) ela deve também ser analisada em seu recesso distal, na quartela.

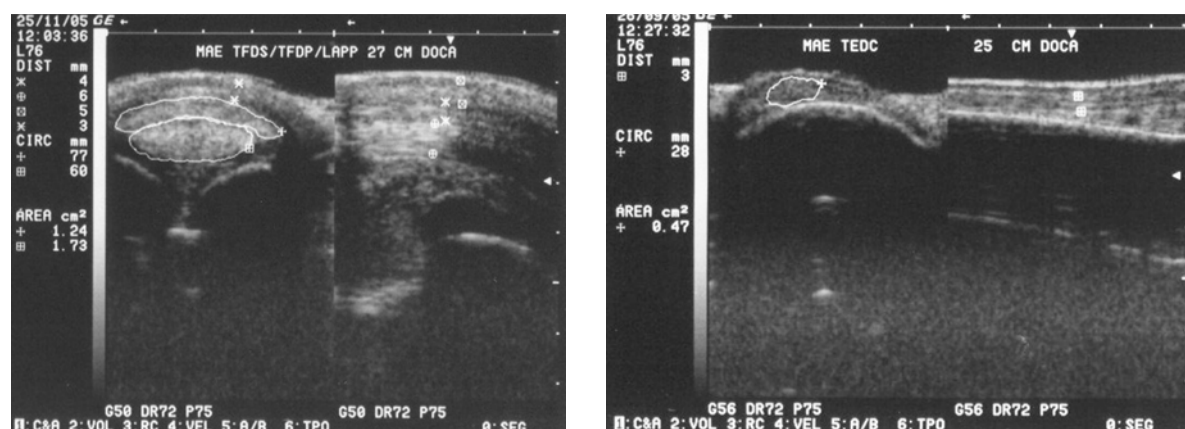


Figura 8. Imagem sonográfica do TFDS, TFDP, LAP (esquerda) e TEDC (direita), em cortes transversal (CT) e longitudinal (CL), demonstrando aparência normal.

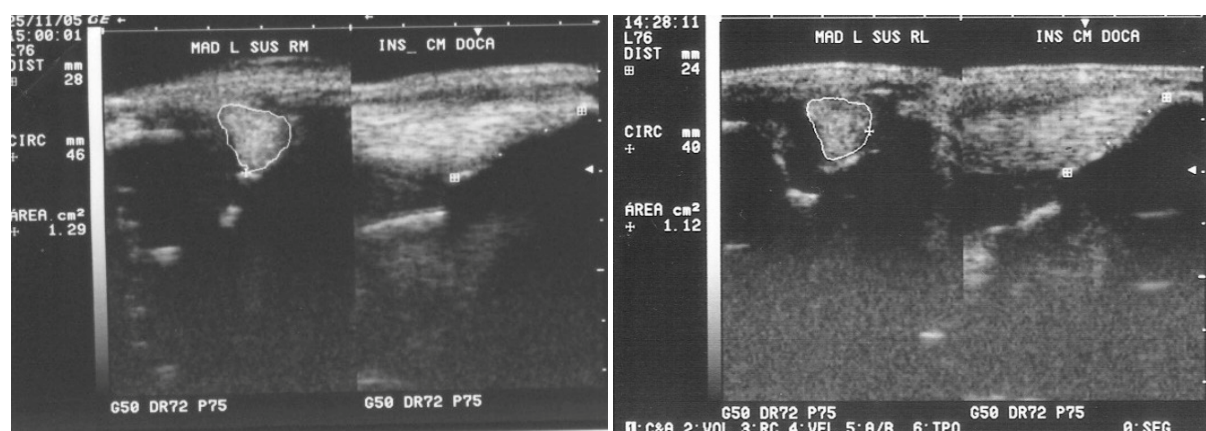


Figura 9: Imagem da inserção do ramo medial (esquerda) e lateral (direita) do Ligamento Suspensor do Boleto em cortes CT e CL, apresentando padrão fisiológico.

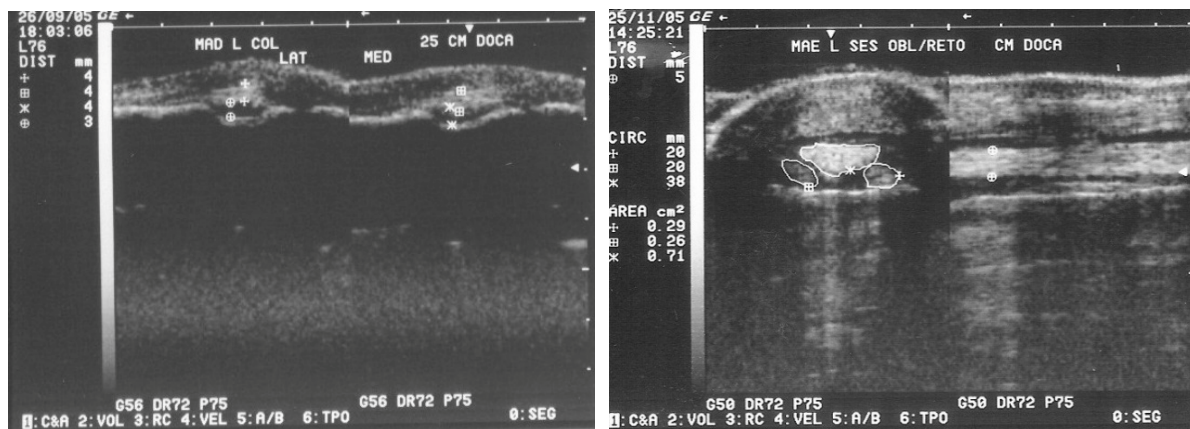


Figura 10. Imagem do ligamento colateral lateral e medial (esquerda), medindo 4 mm de espessura e do espaço ocupado por líquido sinovial, variando de 3 a 4 mm. A direita observam-se os ligamentos sesamoideos reto e oblíquos lateral e medial.

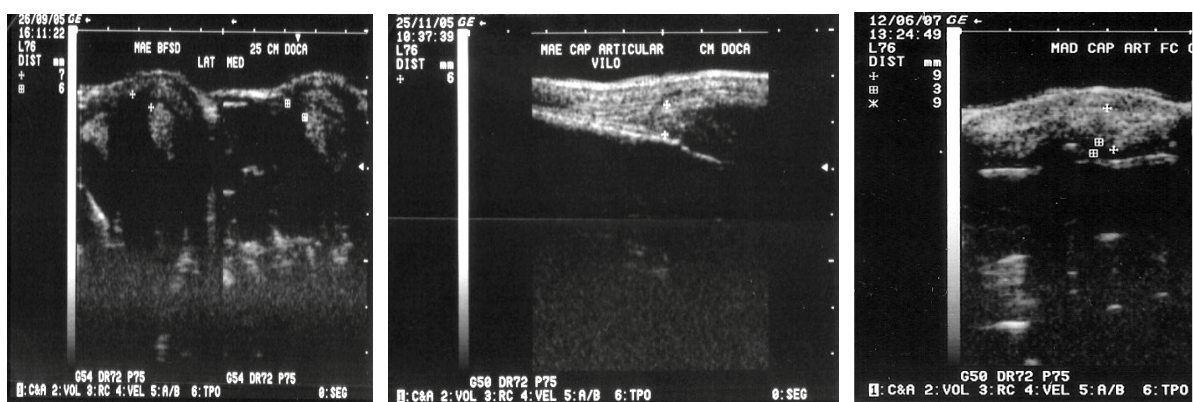


Figura 11. A esquerda observa-se a mensuração dos recessos da bainha flexora sinovial digital; ao centro a mensuração do vilão e a direita da cápsula articular. Todas as estruturas revelaram aparência sonográfica fisiológica.

CONCLUSÕES

Pode-se afirmar que cavalos de Polo possuem estruturas de tecidos moles que compõem a articulação metacarpofalangeana em tamanho semelhante àqueles revelados para animais de hipismo e ainda, que as estruturas pares nesta população, revelaram maior área ou espessura do ramo medial, quando comparado com o lateral.

Com base no exposto, fica clara a necessidade de realizar estudos sobre o exame ultrassonográfico nas diferentes populações equestres, a fim de perceber as particularidades do padrão fisiológico e assim possibilitar a execução de diagnóstico confiável.

AGRADECIMENTOS

Ao proprietário do Haras La Matera, ao Dr. João Guedes, responsável pelo atendimento veterinário do haras no período do estudo, ao comando do Círculo Militar de Polo do Rio de Janeiro-RJ pela utilização de seus animais e ao auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Smith RKW, Birch HL, Batson EL, Patterson-Kane J, Goodman S, Cauvin ER, et al. A review of the etiopathogenesis, and current proposed strategies for prevention, of Barcelos KMC. et al. Exame ultrassonográfico da articulação metacarpofalangeana de equinos praticantes de polo na zona Oeste do Estado do Rio de Janeiro: Protocolo e mensurações. Vet. e Zootec. 2012 set.; 19(3): 407-415.

- superficial digital flexor tendinitis in the horse. In: Proceedings of the 46th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners; 2000, San Antonio, Texas. USA: AAEP; 2000. p.54-8.
2. Rossdale PO, Hopes R, Wingfield DNJ, Offord K. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec.* 1985;116:66-9.
 3. McDiarmid A. Ultrasonography of the palmar metacarpus and pastern in the horse. In *Pract.* 1995;17:368-76.
 4. Denoix JM, Jacot S, Bousseau B, Perrot P. Ultrasonographic anatomy of the dorsal and abaxial aspects of the equine fetlock. *Equine Vet J.* 1996;28:54-62.
 5. Denoix JM, Agrégé FA. Ultrasonographic examination of joints in horses. In: Proceedings of the 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners; 2001, San Diego, California. USA: AAEP; 2001. p.366-75.
 6. Reef VB. *Equine diagnostic ultrasound.* Pennsylvania: W.B. Saunders Company; 1998.
 7. Denoix JM. Ultrasonographic examination in the diagnosis of joint disease. In: McIlwraith W, Trotter GW. *Joint disease in the horse.* Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1996. p.165-202.
 8. Redding WR. Use of ultrasonography in the evaluation of joint disease in horses. Part 1: Indications, technique and examination of the soft tissues. *Equine Vet Educ.* 2001;13:198-204.
 9. Genovese RL, Rantanen NW. The superficial digital flexor tendon. In: Rantanen NW, McKinnon AO. *Equine diagnostic ultrasonography.* Philadelphia: Williams & Wilkins; 1998. p.239-89.
 10. Pugh CR. A simple method to document the location of ultrasonographically detected tendon lesions. *Vet Radiol Ultrasound.* 1993;34:121-211.
 11. Gillis C, Meagher DM, Cloninger A, Locatelli L, Willits N. Ultrasonography cross-sectional area and mean echogenicity of the superficial and deep digital flexor tendons in 50 trained Thoroughbred racehorses. *Am J Vet Res.* 1995;56:1265-9.
 12. Pasin M, Brass KE, Rosauo AC, Oliveira FG, Figueiró GM, Fialho SS, et al. Caracterização ultra-sonográfica dos tendões flexores em equinos: região metacarpiana. *Arq Fac Vet UFRGS.* 2001;29:131-8.
 13. Sander DR, Tucker LR, Johnston GR. Diagnostic ultrasound: applications in the equine limb. In: Ratanen NW, McKinnon AO. *Equine diagnostic ultrasonography.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. p.110.
 14. Reef VB, Whittier M, Allan LG. Joint ultrasonography. *Clin Tech Equine Pract.* 2004;3:256-67.
 15. Whitcomb MB. Ultrasonographic evaluation of the metacarpus, metatarsus, and pastern. *Clin Tech Equine Pract.* 2004;3:238-55.

Recebido em: 12/12/11

Aceito em: 12/07/12

Comitê de Avaliadores

| | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Adelina Maria da Silva | Edson Ramos de Siqueira | José Luiz Laus |
| Adjair Antônio do Nascimento | Eduardo Arruda T. Lanna | José Maurício Sforzin |
| Adriana Evangelista-Rodrigues | Eduardo Bagagli | José Paes de A. N. Pinto |
| Adriano Sakai Okamoto | Eduardo Francisquine Delgado | José Paes de Oliveira Filho |
| Ailton Vitor Pereira | Eduardo Furtado Flores | José Rafael Modolo |
| Alan Maia Borges | Eduardo Harry Birgel Júnior | José Roberto Kfoury Júnior |
| Alessandro F. T. Amarante | Eduardo Paulino da Costa | José Roberto Sartori |
| Alexander Welker Biondo | Edviges Maristela Pituco | José Vasconcelos Lima Oliveira |
| Alexandre Lima de Andrade | Eliana Curvelo | Joselito Nunes Costa |
| Alexandre Oba | Eliana Roxo | Jovanir I. Müller Fernandes |
| Alexandre Secorun Borges | Elizabeth Oliveira da Costa | Julietta Rodini Engrácia de Moraes |
| Alexandre Vaz Pires | Élvio Carlos Moreira | Júlio César de Freitas |
| Alice Maria Melville P. Della Libera | Enrico Lippi Ortolani | Júlio Lopes Siqueira |
| Alicio Martins Júnior | Evelise Oliveira Telles | Kátia Denise Saraiva Bresciani |
| Altivo José de Castro | Fabiano Montiani Ferreira | Kleber Tomás de Resende |
| Alvimar José da Costa | Fernanda da Cruz L. e Alvarenga | Laerte Ferreiro |
| Amauri Alcindo Alfieri | Fernando Antônio de Avila | Lara Borges Keid |
| Américo G. da Silva Sobrinho | Fernando Ferreira | Leandro Rodello |
| Ana Carolina B. C. Fonseca Pinto | Fernando Pandolfo Bortolozzo | Leucio Câmara Alves |
| Ana Liz Garcia Alves | Flávia de Rezende Eugênio | Lílian Gregory |
| Ana Paula Frederico R. L. Bracarense | Flavio Ruas de Moraes | Lisiane de A. Martins |
| Ana Sílvia A. M. T. Moura | Francisco Carlos Faria Lobato | Lissandro Gonçalves Conceição |
| Ana Terezinha Tavechio | Francisco José Teixeira Neto | Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini |
| Andrey Pereira Lage | Francisco Leydson Formiga Feitosa | Luciana Morganti Ferreira Maselli |
| Andrigo Barboza de Nardi | Frederico Ozanam Papa | Luciano José da Costa Figueiredo |
| Ângelo João Stopiglia | Geder Paulo Herrmann | Luís Carlos Vulcano |
| Annelise de Souza Traldi | Germano Francisco Biondi | Luís Gustavo Corbellini |
| Antônio Carlos Alessi | Gervásio Henrique Bechara | Luiz Alberto do Lago |
| Antonio Carlos Cunha Lacrete Júnior | Gilson Helio Toniollo | Luiz Antônio Mathias |
| Antônio Carlos Paes | Guilherme Jordão Magalhães Rosa | Luiz Augusto do Amaral |
| Antônio José de Araújo Aguiar | Gustavo Ferrer Carneiro | Luiz Carlos de Souza |
| Antonio Nader Filho | Helenice de Lima González | Luiz Fernando de O. S. Carvalho |
| Antônio Sérgio Ferraudó | Helenice de Souza Spinosa | Luiz Francisco Prata |
| Aparecido Antônio Camacho | Helio José Montassier | Luiz Francisco Zafalon |
| Aramis Augusto Pinto | Henrique Nunes de Oliveira | Luiz Henrique de Araújo Machado |
| Áureo Evangelista Santana | Humberto Tonhati | Luzia Helena Queiroz |
| Bernardete Miranda dos Santos | Idécio Luiz Sinhorini | Magda Alves de Medeiros |
| Bruna P. A. da Fonseca | Iolanda Aparecida Nunes | Marcelo Bahia Labruna |
| Bruno Watanabe Minto | Ivanete Kotait | Marcelo George Mungai Chacur |
| Caris Maroni Nunes | Ivanete Susin | Marcelo Meller Alievi |
| Carla Forte Maiolino Molento | Iveraldo dos Santos Dutra | Marcelo Resende de Souza |
| Carla Lopes de Mendonça | Ivo Wentz | Marcelo Vasconcelos Meireles |
| Carlos Alberto de M. Lopes | Izidoro Francisco Sartor | Márcia C. da Sena Oliveira |
| Carlos Antônio de Miranda Bomfim | Jackson Victor de Araújo | Márcia Marinho |
| Carlos Augusto A. Valadão | Jane Megid | Márcia Marques Jericó |
| Carlos Roberto Daleck | Jean Carlos Ramos da Silva | Márcia Valéria Rizzo S. Szabó |
| Carlos Roberto Teixeira | Jean Guilherme F. Joaquim | Marcílio Dias S. da Mota |
| Carolina Madeira Lucci | Jener Alexandre S. Zuanon | Márcio Machado Ladeira |
| Cassiano Victória | João Carlos Pinheiro Ferreira | Marco A. F. Lopes |
| Cecílio Soares Filho | João Guilherme P. Filho | Marco Antonio Alvarenga |
| Célia Regina Orlandelli Carrer | João Pessoa Araújo Júnior | Marco Antonio Gioso |
| Celso A. Rodrigues | José Antônio Marques | Marco Antonio Lemos de Oliveira |
| Cezinande de Meira | José Antônio Viana | Marconi Rodrigues de Farias |
| Ciniro Costa | José Antônio Visintin | Marcos Amaku |
| Cláudia Valéria S. Brandão | José Augusto B. Afonso | Marcos Chalhoulb Coelho Lima |
| Cláudio Dias Timm | José Carlos de Andrade Moura | Marcos Jun Watanabe |
| Claudio Scapinello | José Carlos de Andrade Moura | Marcos Veiga dos Santos |
| Daisy Pontes Netto | José Cezar Panetta | Margareth Elide Genovez |
| Daniel Augusto Barroso Lessa | José Dantas Ribeiro Filho | Maria Angélica Miglino |
| Dante Pazzanese Duarte Lanna | José Domingos Guimarães | Maria Cecília Rui Luvizotto |
| Delphim da Graça Macoris | José Fernando Machado Menten | Maria da Glória Buzinaro |
| Denise Botelho de O. Braga | José Joaquim Tilton Ranzani | Maria de Lourdes R. S. da Cunha |
| Dilermando Miranda da Fonseca | José Juradir Fagliari | Maria Denise Lopes |
| Dirlei Antônio Berto | José Laerte Nörnberg | Maria Gisela Laranjeira |
| Domingos da Silva Leite | José Luiz Catão Dias | Maria Jaqueline Manprim |

Maria Lucia Gomes Lorenço
Maria Lúcia Zaidan Dagli
Maria Luiza Delavechia
Maria Madalena Pessoa Guerra
Maria Terezinha S. Peraçoli
Márcia Valéria Rizzo S. Szabó
Maria Verônica de Souza
Marilena Longo Büll
Marília Martins Melo
Marion Burkhardt de Koivisto
Mary Marcondes
Mauricio Costa Alves da Silva
Mayra Elena O. D'Avila Assumpção
Milton Hissashi Yamamura
Mitika Kuribayashi Hagiwara
Mônica Vicky Bahr Arias
Nei Moreira
Nelson Carneiro Baião
Nelson Moraes
Nereu Carlos Preste
Nilson Roberto Benites
Noeme Sousa Rocha
Oswaldo Durival Rossi Junior
Pacífico Antônio Diniz Belém
Paulo Alberto Lovatto
Paulo César Ciarlini
Paulo Fernando Machado
Paulo Francisco Domingues
Paulo Henrique Franceschini
Paulo Henrique Jorge da Cunha
Paulo Michel Roehe

Paulo Roberto Brandão
Paulo Roberto de Lima Meirelles
Paulo Roberto Rodrigues Ramos
Pedro Manuel Leal Germano
Priscilla Anne Melville
Raimundo Souza Lopes
Raphael Lúcio Andreatti Filho
Raquel Y. A. Baccarim
Raul Franzolin Neto
Raul José Silva Giro
Regina Kiomi Takahira
Renato Campanarut Barnabé
Renato Cesar Sacchetto Tôres
Renée Laufer Amorim
Ricardo Augusto Mendonça Vieira
Ricardo de Oliveira Orsi
Ricardo J. Del Carlo
Roberta Lemos Freire
Roberto Antonio Rodella
Roberto Calderón Gonçalves
Roberto de Oliveira Roça
Roberto Sartori Filho
Roberto Soares de Castro
Rodrigo Martins Soares
Rogério de Paula Lana
Rogério Giufrida
Rogério Martins Amorim
Ronaldo Lopes Oliveira
Rosana M. O. Clark
Rosângela Zacarias Machado
Rubens Antônio Carneiro

Samir Issa Samara
Sandra de Moraes Gimenes Bosco
Sandra Mara Araújo Crispim
Sebastião de Campos Valadares Filho
Sergio Borges Mano
Sheila Canavese Rahal
Sílvia M. Nishida
Sílvia Maria Alves Gomes
Simone Baldini Lucheis
Simone de Carvalho Balian
Sonia Regina Pinheiro
Sony Dimas Bicudo
Stefano Hagen
Stélio Pacca Loureiro Luna
Teresa C. G. de O. Siqueira
Tereza Cristina C. da Silva
Valéria Marçal Félix de Lima
Valéria Nobre L. S. Oliva
Vamilton Alvares Santarém
Vanerli Beloti
Vania Maria de V. Machado
Venício José de Andrade
Vera Lúcia M. Hall
Victor Cruz Rodrigues
Virgínia Bodelão Richini Pereira
Wagner dos Reis
Wagner Luis Ferreira
William Koury Filho
Wilter Ricardo R. Vicente

REVISTA “VETERINÁRIA E ZOOTECNIA”

NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, do lado direito da página. Digitá-los, separados um por linha, com **chamadas** de rodapé numeradas e em sobrescrito, **que indicarão** o cargo e o endereço profissional dos autores, seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e 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. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5 Conference paper

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

6 Dissertation

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

7 Electronic material on Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <<http://www.milkpoint.com.br>>.

REVISTA “VETERINARIA Y ZOOTECNIA”

NORMAS PARA PRESENTACIÓN DE TRABAJOS

La Revista **Veterinaria y Zootecnia**, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, publica artículos científicos originales, artículos de revisión de bibliografía, estudios de caso y comunicaciones cortas, relacionadas con las áreas de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, con periodicidad semestral, en las lenguas Portugués, Español o Inglés, siendo los conceptos y opiniones emitidas, de exclusiva responsabilidad de los autores.

La publicación depende de la evaluación preliminar del Presidente del Consejo Editorial, que analiza la relevancia, y los aspectos formales, de acuerdo con la categoría del artículo sometido y las normas editoriales establecidas. Si es aprobado, se adopta el mérito de la evaluación por pares, se envía para dos Revisores, de acuerdo con el área. Los conceptos además de la imparcialidad, serán mantenidos bajo estricta reserva, sin que exista la posibilidad de identificación entre autores y evaluadores. Los artículos no publicados serán devueltos.

Los trabajos deben ser enviados pela página WEB de la revista <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>

Prof. Helio Langoni

Revista “Veterinaria y Zootecnia”

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

18618-000 – Dist. Rubião Junior – SP – Brasil

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Deben ser estructurados de acuerdo con los siguientes puntos:

1. Página principal, con:

- Título del trabajo en portugués, inglés y en español, tipo de letra Times New Roman, número 12, con espacio entre líneas sencillo, en negrilla y centrado, en letra mayúscula. Cuando sea necesario, indicar la entidad que financia la investigación, como primer pié de página;
- Nombres completos de los autores, en los cuales solamente la primera letra de cada nombre debe ser mayúscula, en lado derecho de la página. Digitalarlos separados un por línea, con **notas de pié** de página numeradas y en sobrescrito, **que indicarán** el cargo y la dirección profesional de los autores, seguidos de la institución donde el trabajo fue realizado o en las cuales están vinculados;
- Nombre, dirección, teléfono, fax y correo electrónico para correspondencia.
- En el caso de involucrar seres humanos o animales de experimentación, enviar el concepto de la Comisión de Ética o equivalente, destacando en el trabajo antes de las referencias y fecha de aprobación, así como el envío de la copia del concepto.

2. Página con resumen en Portugués, Inglés y Español.

- Tanto el “resumo”, como el “abstract”, así como el resumen, deben estar seguidos del título del trabajo, en el idioma respectivo y contener, como máximo 400 palabras cada uno, con informaciones referentes a la introducción, metodología, resultados y conclusiones. El texto debe estar ajustado (justificado) y digitado en un solo párrafo y 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. Intoxicación por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Freqüência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organización como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Libro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Capítulo en libro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5 Ponencias o conferencias en simposio, congreso, reuniones, etc .

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 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>>.