Tópicos Especiais em Ciência Animal IX

PPGCV
Programa de Pós-graduação
em Ciências Veterinárias
CCAE-UFES

ORGANIZADORES
Maria Aparecida da Silva
Leonardo Oliveira Trivilin
Leonardo Demier Cardoso
Juliana Alves Resende

MARIA APARECIDA DA SILVA
LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN
LEONARDO DEMIER CARDOSO
JULIANA ALVES RESENDE
(ORGANIZADORES)

TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL IX

1ª EDIÇÃO

ALEGRE-ES

CAUFES

2020

CCAE-UFES
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo
Alto Universitário, s/n, Guararema, Alegre-ES
Telefone: (28) 3552-8955 – Fax (28) 3552-8903
www.alegre.ufes.br/ccae
ISBN: 978-65-86981-09-4
Editor: CAUFES
Novembro 2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

T674 Tópicos especiais em ciência animal IX [recurso eletrônico] / Organizadores Maria Aparecida da Silva… [et al]. - Dados eletrônicos. - Alegre : CAUFES, 2020.
404 p. : il.

Inclui bibliografia.
ISBN: 978-65-86981-09-4

Modo de acesso: http://www.cienciasveterinarias.ufes.br/pt-br/topicos-especiais-em-ciencia-animal-teca

1. Medicina veterinária. 2. Zootecnia. 3. Nutrição Animal. 4. Diagnóstico. I. Silva, Maria Aparecida da, 1983.

CDU: 619

Elaborado por Raniere Barros Barreto – CRB-6 ES – 000861/O

Os textos apresentados nessa edição são de inteira responsabilidade dos autores. Os organizadores não se responsabilizam pela revisão ortográfica, gramatical e autenticidade do conteúdo dos capítulos apresentados.

REITOR – UFES
PAULO SÉRGIO DE PAULA VARGAS

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – UFES
LOUISIANE DE CARVALHO NUNES

COORDENADOR - PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
JOSÉ DE OLIVEIRA CARVALHO

ORGANIZADORES DESTA OBRA
MARIA APARECIDA DA SILVA
LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN
LEONARDO DEMIER CARDOSO
JULIANA ALVES RESENDE

ILUSTRADOR DA CAPA E CONTRACAPA
MARIETA CRISTINA COUTO KUSTER

APRESENTAÇÃO

O Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo (PPGCV-UFES), localizado em Alegre no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, publica desde 2012 volumes anuais de “Tópicos Especiais em Ciência Animal” (TECA). O livro é produzido por seus docentes e discentes com revisões sistemáticas no que tange a ciência e produção animal, ficando disponível gratuitamente no sítio eletrônico da PPGCV.

A geração do material tem papel relevante na formação de pós-graduandos e fornece conteúdo técnico-científico acessível a estudantes e a comunidade além dos muros da universidade. O sucesso dos volumes anteriores motiva os organizadores e a comunidade acadêmica a publicar pelo nono ano consecutivo em formato de livro, todo conteúdo elaborado com o intuito de atualizar e propagar conhecimento, algo que tanto fascina a humanidade, e é inerente ao seu desenvolvimento.

Em meio ao maior desafio global dos últimos tempos, com a pandemia de COVID-19 causada pelo Sars-CoV-2, a pesquisa e educação ganham ainda mais destaque na manutenção de uma sociedade vívida e perene. Com este sentimento, a Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFES apresenta a obra “Tópicos Especiais em Ciência Animal IX”. Assim como, se solidariza, homenageia e dedica a obra às milhares de vítimas fatais em decorrência da COVID-19 e aos profissionais que direta ou indiretamente trabalharam no combate à pandemia.

OS ORGANIZADORES

LISTA DE AUTORES

Adilson Vidal Costa. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: avcosta@hotmail.com.

Adriano Lima Stelzer Bindaco. Universidade Vila Velha, e-mail: adrianostelzer48@gmail.com

Alana Camargo Poncio. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: alana_cp2@hotmail.com

Alberto Chambela Neto. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: chambela@ifes.edu.br

Alice Cristina Morgado Cassa. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: alicecriscassa@gmail.com

Amanda Maria Miranda Rodrigues dos Santos. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amanda_mmrs@hotmail.com

Ana Flávia Ferreira Selva. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: aflavia44@hotmail.com

Barbara Rauta de Avelar. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e-mail: barbararauta@gmail.com

Beathriz Giostri Pontes. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: bia.giostri@gmail.com

Caio Vaz Baqui Lima. Médico Veterinário Autônomo, e-mail: caiobaqui@hotmail.com

César Oliveira Liesner. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: cesarliesner01@hotmail.com

Daiana Freitas Ferreira. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: daiafreitasferreira@hotmail.com.br

Débora de Souza Pozzatto. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: pozzatto.debora@hotmail.com

Débora Marciana da Silva Santos. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: deborasilvasantos02@gmail.com

Délia Chaves Moreira dos Santos. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: deliachavesmoreira@gmail.com

Driéle Lutzke. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: drielelutzke@gmail.com

Elder de Oliveira Caetano. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: elder.oliveirac@icloud.com

Elisabeth Maria López de Prado. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: elisabeth.prado7@gmail.com

Eliseu Polastreli Pirovani. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: eliseupolaspir@gmail.com

Erika Takagi Nunes. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: erikatnunes@gmail.com

Felipe Martins Pastor. Universidade Federal de Uberlândia, e-mail: felipempastor@gmail.com

Franciely Mota de Oliveira. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: franciely.mvet@gmail.com

Gabriela de Oliveira Resende. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gabrielaoresende@hotmail.com

Gabriela Rocha de Assunção. Universidade Federal do Espírito Santo: e-mail: gabrielarochaassuncao@gmail.com

Geanne Aparecida de Paula. Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: geannerabello@hotmail.com

Isabella Vilhena Freire Martins. Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: isabella.martins@ufes.br

Janaina Cecília Oliveira Villanova. Universidade Federal do Espírito Santo, email: pharmacotecnica@yahoo.com.br

Jankerle Neves Boeloni. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jankerle@gmail.com

João Victor Nascimento Tardim. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: jvntardim@gmail.com

Jorge Luiz Rizzo Gervais. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jorluiz1998@gmail.com

José Geraldo de Vargas Júnior. Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: jose.vargas@ufes.br

Joyce Garcia Silva. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: joyce_g_silva@hotmail.com

Juliana Alves Resende. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: juliana.resende@ufes.br

Juliana Aparecida Severi. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: juseveri@yahoo.com.br

Júlio Francisco Valiati Marin. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: julio_valiati@hotmail.com

Karina Preising Aptekmann. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kapreising@gmail.com

Larissa Marchiori Sena. Faculdade Pitágoras, e-mail: lmsmvet@gmail.com

Layon Carvalho de Assis. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: layoncdeassis@gmail.com

Leonardo Demier Cardoso. Instituto Federal do Espirito Santo, e-mail: leonardodemier@hotmail.com

Leonardo Oliveira Trivilin. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: leotrivilin@gmail.com

Letícia Azeredo de Freitas. Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: leticiaazeredof@gmail.com

Letícia Parmanhani Romão. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: leticiaparmanhani@gmail.com

Lhydyany Gonçalves Furtado de Melo. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lhydyanymelo@gmail.com

Louisiane de Carvalho Nunes. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: louisianecn@gmail.com

Lucas Dewilliam Paixão de Vasconcelos. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lucas-d-vasconcelos@hotmail.com

Luiza Aparecida Campos de Paula. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: luzpaula.campos@gmail.com

Luiza Laura de Souza Oliveira. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lsouluiza15@gmail.com

Luma de Oliveira Mulinari. Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: luma.mulinari@hotmail.com

Marcelo Henrique Otenio. Embrapa Gado de Leite, e-mail: marcelo.otenio@embrapa.br

Marcos Santos Zanini. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: marcos.zanini@ufes.br

Maria Aparecida da Silva. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mvmariaaparecida@gmail.com

Maria Mauri Marques. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mmaurimarques@gmail.com

Mariana Drummond Costa Ignacchiti. Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: mariana.ignacchiti@ufes.br

Márian de Jesus Pereira. Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: marianjesuspereira@hotmail.com

Matheus Joaquim dos Santos Candido. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mcandido0352@gmail.com

Mayara Correa Dias de Souza. Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: mayaracorreadias@gmail.com

Maxwell Feliciano Simões. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mxw.feliciano@gmail.com

Mikaela Vieira Beloni. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mikaelabeloni@hotmail.com

Nicolly Soares Ferreira. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ni.colly_ferreira@hotmail.com

Nubya Nascimento Costa. Universidade Federal do Espírito Santo, email: nubyacosta@hotmail.com

Paola de Oliveira Santos. Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: paolamanfredini111@gmail.com

Pedro Pierro Mendonça. Instituto Federal do Espírito Santo: e-mail: ppierrom@gmail.com

Priscila de Oliveira Lorenzoni. Universidade Federal do Espírito Santo e-mail: priscilalorenzoni@gmail.com

Renato Almeida Brambati. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: renato_brambatti@yahoo.com.br

Rodolfo Moreira Baptista. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: rodolfombaptista@outlook.com

Sanderson Vieira Batista. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: sanderson14@ucl.br

Sara Oliveira Maia. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: saramaia.o.sm@gmail.com

Sergio Antonio Fernandes. Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: sefernandes@gmail.com

Shaira Grulke Ribeiro. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: shairagrulker25@outlook.com

Silvia Pope de Araújo. Universidade Federal do Rio de Janeiro, e-mail: silviapopedearaujo@gmail.com

Sthefany Brito Salomão. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: sthefanybritosalomao@gmail.com

Talita de Cássia Pena Pastore. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: talitacassia6@gmail.com

Tayna Avelino Pereira. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: taynaprinci2@hotmail.com

Thaís Gonçalves Tavares. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: thastavares@yahoo.com.br

Thaís Martins da Silva. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: martins.tms@outlook.com

Théo Matos Arantes Moraes. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: theomatos@yahoo.com.br

Vagner Tebaldi de Queiroz. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vagnertq@gmail.com

Vanderson de Ataide Paulucio. Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vandersonpaulucio.zoo@gmail.com

Venâncio Cardoso de Magalhães e Santos. Universidade Federal do Espírito Santo, magalhaes.venancio93@gmail.com

Venan Vieira dos Anjos. Instituto Federal do Espírito Santo: e-mail: vieira.venan@gmail.com

SUMÁRIO

Capítulo 1- Além do colágeno tipo I: outros fatores influentes sobre a resistência óssea... 13

Capítulo 2- Megaesôfago em cães – revisão de literatura 30

Capítulo 3- Neoplasias da cavidade nasal e seios paranasais em animais domésticos: aspectos anatomopatológicos..... 44

Capítulo 4- Leucemia viral felina: aspectos gerais e terapia antiviral..... 62

Capítulo 5- Principais agentes infecciosos em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*)..... 82

Capítulo 6- Alterações morfológicas em quelônios que ocorrem no Brasil e suas possíveis causas..... 96

Capítulo 7- Avanços no diagnóstico da tuberculose bovina..... 112

Capítulo 8- Esclarecendo o diagnóstico parasitológico em aves domésticas: atualidades e perspectivas..... 130

Capítulo 9- Avaliação ecocardiográfica da função atrial esquerda: importância e perspectivas em medicina veterinária..... 152

Capítulo 10- Mutação MDR1-1Δ e glicoproteína-P: importância na clínica de animais de companhia..... 166

Capítulo 11- Terapêutica para diferentes tipos de choque em animais de companhia…..... 186

Capítulo 12- Formas farmacêuticas alternativas para uso na farmacoterapia veterinária… 207

Capítulo 13- Produtos farmacêuticos para uso como adjuvantes na higienização bucal de cães..... 225

Capítulo 14- Complexos de inclusão: o uso das ciclodextrinas na medicina veterinária…. 243

Capítulo 15- Atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente a agentes causadores da mastite bovina..... 262

Capítulo 16- Pesquisa de produtos naturais para cicatrização de feridas..... 282

Capítulo 17- Técnicas in vitro e in vivo utilizadas para avaliar o efeito de produtos naturais no controle de carrapatos..... 302

Capítulo 18- Técnicas de filtragem utilizadas na aquicultura..... 320

Capítulo 19- Comportamento, bem estar e ambiência de animais aquáticos..... 340

Capítulo 20- Importância da necropsia de peixes como indicadores da saúde ambiental… 354

Capítulo 21- Imunonutrientes em avicultura de postura..... 373

Capítulo 22- Biodigestão anaeróbia: uma alternativa viável para a redução dos impactos causados pelos dejetos da pecuária leiteira..... 386

Além do colágeno tipo I: outros fatores influentes sobre a resistência óssea

Felipe Martins Pastor[1]
Gabriela de Oliveira Resende[2]
Júlio Francisco Valiati Marin[3]
Maria Aparecida da Silva[4]

[1] Universidade Federal de Uberlândia, e-mail: felipempastor@gmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gabrielaoresende@hotmail.com
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: julio_valiati@hotmail.com
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mvmariaaparecida@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Os ossos são órgãos multifuncionais, que atuam desde a sustentação e dissipação das cargas fisiológicas associadas à locomoção, até a homeostase mineral. Por seu papel central na locomoção, os ossos são constantemente submetidos à variadas tensões, que, ao excederem o limite fisiológico da resistência tecidual, originam fraturas. Por tal razão, pesquisas no campo da biomecânica óssea se tornam essenciais, uma vez que permitem melhor entendimento da etiologia e fisiopatogenia das fraturas, auxiliando assim, na escolha da abordagem terapêutica adequada (MARKEL et al., 1994; NISHIOKA et al., 2011).

Ressalta-se que as propriedades biomecânicas ósseas podem sofrer influência de diversos fatores intrínsecos ao tecido ósseo. Tais fatores, podem, em determinado grau, tornar o tecido menos resistente e mais predisposto a fraturas, sejam elas originadas ou não por cargas fisiológicas (FRIEDMAN, 2006).

Devido ao avanço das técnicas de diagnóstico e terapêutica em Medicina Veterinária, alterações patológicas, até então exclusivamente humanas, vem sendo descobertas e tratadas constantemente nos animais. Dentre tais alterações, aquelas relacionadas ao tecido ósseo são de grande importância, não apenas para tais órgãos, mas para a homeostasia do organismo de forma geral. Dada a importância do estudo da resistência óssea na compreensão da etiologia, fisiopatogenia e terapêutica das fraturas, o presente capítulo foi conduzido com o objetivo de elucidar o papel dos fatores influentes, a exceção do colágeno tipo I, sobre a resistência mecânica do tecido ósseo.

2 FATORES INFLUENTES SOBRE A RESISTÊNCIA ÓSSEA, A EXCEÇÃO DO COLÁGENO TIPO I

A subárea da mecânica responsável pela delimitação e estudo das características influentes sobre os processos de aposição e reabsorção do tecido ósseo, é denominada de biomecânica óssea (SCHMAEDECKE, 2007). A partir do avanço das pesquisas relacionadas à biomecânica óssea e dos efeitos desencadeados pela aplicação de determinada carga a um osso, se torna possível melhor compreensão dos eventos relacionados à etiologia das fraturas ósseas (RADASCH, 1999). Da mesma forma, a biomecânica também é capaz de predizer o comportamento ósseo *in vivo*, de forma a considerar a capacidade absortiva de energia do órgão, as tensões musculares às quais o órgão está predisposto, além de elucidar o nível de influência da arquitetura tecidual sobre sua resistência mecânica (CURREY, 1970).

De acordo com Einhorn (1992), descrevem-se de forma didática as propriedades mecânicas em dois níveis distintos. No primeiro, consideram-se as propriedades materiais, as quais são dependentes apenas da estrutura tecidual, sendo elas: elasticidade (capacidade de recuperação da forma após cessada a aplicação da carga), plasticidade (deformação irreversível), rigidez (trata-se da necessidade da aplicação de maior força a fim de ocorrer mínima deformação elástica), flexibilidade (oposto de rigidez, grande deformação com a aplicação de menor força), tenacidade (que também pode ser denominada dureza, é a capacidade de resistir a deformação plástica) e resistência (capacidade do material de evitar que sua integridade seja perdida).

O segundo nível, por sua vez, compreende as propriedades estruturais, as quais são influenciadas pela geometria óssea e sua estrutura macroscópica e submacroscópica, como: viscoelasticidade (as propriedades de tensão e deformação, bem como a resistência, dependem da velocidade de aplicação da força), fragilidade (capacidade de suportar baixa taxa de deformação plástica), ductilidade (capacidade de suportar alta taxa de deformação plástica) e anisotropia (não equivalência das propriedades mecânicas nas direções que a carga é aplicada) (EINHORN, 1992).

Atualmente encontram-se bem estabelecidos, que além do colágeno tipo I e suas particularidades, há diversos fatores potencialmente influentes sobre a biomecânica óssea. Estes, são organizados de forma sistemática, tendo como base o arranjo hierárquico do tecido ósseo, ou seja, a estrutura tecidual (FIGURA 1) (HERNANDEZ; KEAVENY, 2006; MCCREADIE et al., 2001; SEEMAN, 2008).

Figura 1 – Fatores da organização hierárquica do osso influentes sobre a biomecânica óssea.
Fonte: Adaptado de Fonseca et al. (2014).

Dentre os principias fatores capazes de exercer influência sobre a resistência tecidual óssea, podem-se citar: as propriedades teciduais, que levam em consideração principalmente as características bioquímicas dos componentes, como cristalinidade da hidroxiapatita e os tipos de ligação entre as cadeias de colágeno; a microarquitetura, que retrata a composição tecidual, representada pela proporção de hidroxiapatita, colágeno tipo I, água e demais proteínas não colagênicas; e por fim, a conformação óssea, que diz respeito à morfologia do osso como órgão, e inclui a quantidade e distribuição dos tecidos cortical e trabecular (BOUXSEIN, 2003; FONSECA et al., 2014).

Os principais fatores de influência sobre a resistência óssea serão abordados nos tópicos subsequentes.

2.1 PROPRIEDADES TECIDUAIS

Dentre as propriedades teciduais ósseas, a atividade celular exerce papel fundamental sobre os parâmetros biomecânicos do órgão. Em meio à população celular constituinte do tecido ósseo, os osteócitos se destacam como os mais prevalentes e mais importantes no processo de remodelamento ósseo (BONEWALD, 2011). O processo de apoptose deste tipo celular é capaz

de ativar a reabsorção local, por meio do aumento da atividade dos osteoclastos (KURATA et al., 2006). Além disso, a formação de microtrincas no tecido estimula o remodelamento, por desencadear a apoptose dos osteócitos no local da trinca (CARDOSO et al., 2009).

A ativação da reabsorção osteoclástica se dá por meio da interrupção na inibição dos osteoclastos. Essa ação é mediada pelos osteócitos, ao liberarem fatores estimuladores durante seu processo de apoptose (GU et al., 2005; KOGIANNI; MANN; NOBLE, 2008; KURATA et al., 2006). Apesar de a osteólise osteoclástica ser fisiologicamente a maior responsável pela renovação do tecido danificado e mecanicamente frágil, em situações nas quais ocorre aumento na taxa de apoptose dos osteócitos, há reabsorção anormal e por consequência, aumento da porosidade, o que compromete a resistência óssea (TATSUMI et al., 2007). Além disso, osteócitos que apresentem alterações em sua morfologia, como perdas de prolongamentos citoplasmáticos, são deficientes no processo de mecanotransdução, o que afeta a qualidade do tecido local e prejudica o reparo necessário da região danificada (DUNSTAN; SOMERS; EVANS, 1993).

Os osteócitos possuem ainda importante papel na regulação da homeostase mineral no organismo, por meio do processo denominado osteólise osteocítica. Nesta situação, tais células atuam de forma a reabsorver a matriz óssea, disponibilizando os íons cálcio e fósforo no sangue. Dessa forma, o osteócito se torna a principal célula a atuar na homeostase mineral, uma vez que o papel regulatório dos osteoclastos corresponde somente a 0,1% do total, sendo, portanto, insuficiente (RAMP; NEUMAN, 1971).

O estímulo para iniciação da osteólise osteocítica reside na maior demanda metabólica por cálcio, como nos casos em que há aumento dos níveis séricos de paratormônio (KREMPIEN et al., 1976; TAZAWA et al., 2004), osteodistrofia de origem renal (BONUCCI; GHERARDI, 1977) ou estádios fisiológicos específicos que culminem com alta demanda de cálcio, como a lactação, hibernação ou estação reprodutiva (ALCOBENDAS; BAUD; CASTANET, 1991; HALLER; ZIMNY, 1977; KWIECINSKI; KROOK; WIMSATT, 1987). As alterações morfológicas nos osteócitos em atividade reabsortiva estão representadas na Figura 2.

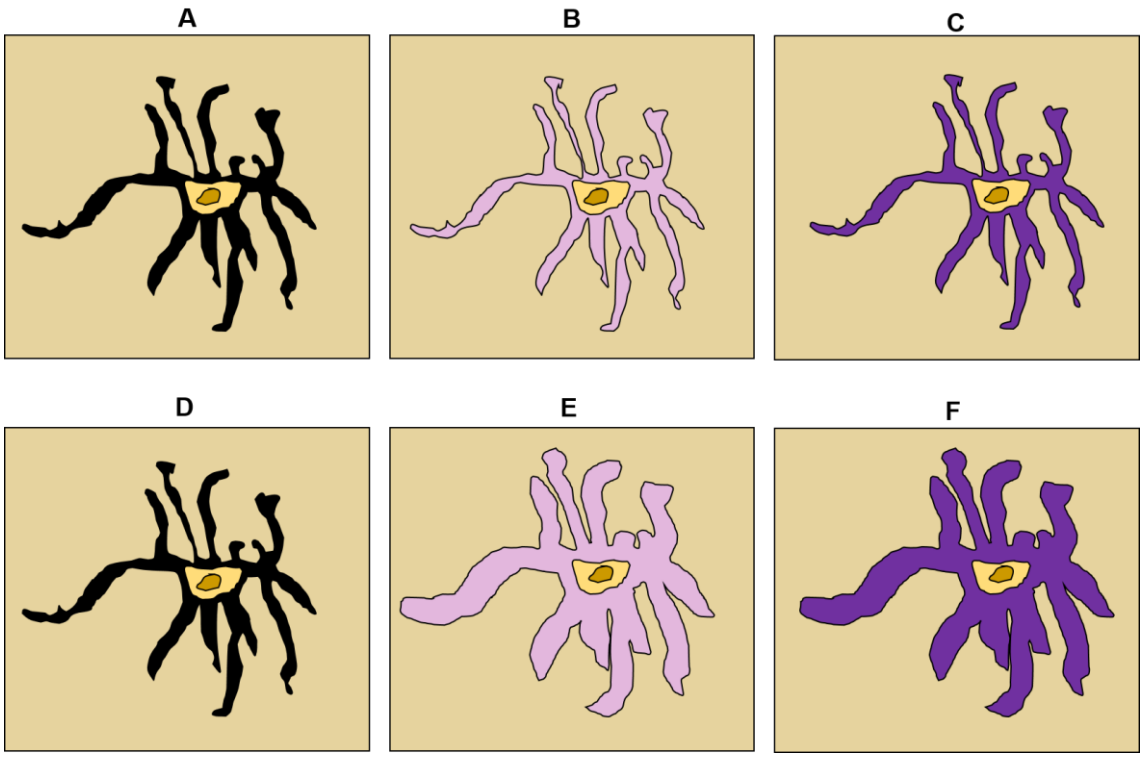

Figura 2 – Esquema das alterações morfológicas nos osteócitos em atividade reabsortiva. A, B e C) Osteócito em atividade reabsortiva fisiológica, onde não são observadas alterações morfológicas significativas. A) Repouso. B) Reabsorção. C) Remineralização. D, E e F) Osteócito em osteólise osteocítica em caso de alterações patológicas, onde observa-se enlarguecimento das lacunas e canalículos. D) Repouso. E) Reabsorção. F) Remineralização.
Fonte: Adaptado de Teti e Zallone (2009).

Histologicamente, pode-se reconhecer o tecido ósseo em processo de osteólise osteocítica pelo enlarguecimento das lacunas dos osteócitos, fragmentação das fibras colágenas e redução da quantidade de cristais de hidroxiapatita pericanaliculares (KREMPIEN et al., 1976). Tazawa et al. (2004) descrevem a presença de matriz óssea de aspecto imaturo e pouco mineralizada ao redor dos osteócitos, com coloração basofílica, em secções coradas em Hematoxilina e Eosina, ou, de coloração metacromática, quando coradas por Azul de Toluidina. Os autores atribuem essa morfologia à capacidade regenerativa da matriz óssea local, realizada pelos osteócitos após estímulo reabsortivo.

Além das funções anteriormente relatadas, os osteócitos também atuam no processo de aposição óssea, por meio da secreção de mediadores químicos que possuem papel no recrutamento de osteoblastos. Como exemplo, citam-se o óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, que são secretados pelos osteócitos durante o processo de mecanotransdução, e agem de modo a induzir a osteogênese pela ativação dos osteoblastos (KLEIN-NULEND et al., 2013; VATSA et al., 2006). Tendo em vista seu papel multifuncional, nota-se a importância dos osteócitos na biomecânica óssea, uma vez que a redução do nível populacional destas células possui

correlação com a diminuição da resistência mecânica do osso (FONSECA et al., 2014; QIU et al., 2003; TATSUMI et al., 2007).

O declínio populacional de osteócitos e sua relação com as modificações na resistência óssea podem ser desencadeadas pelo grau de hidratação tecidual, tendo em vista que, em tecidos rígidos, a água possui papel fundamental na biomecânica, aumentando a fragilidade local em casos de desidratação (MISEREZ et al., 2008). A água presente no osso está localizada, sobretudo, ao redor do osteócito e ao longo de seus prolongamentos, e, por tal razão, a apoptose desse tipo celular afeta o nível de hidratação tecidual (WEINSTEIN et al., 2010; WILSON et al., 2006). No entanto, mesmo a apoptose afetando o grau de hidratação tecidual e reduzindo a população viável de osteócitos, ainda assim é um evento extremamente necessário no controle do remodelamento e reparo das microtrincas, sendo essencial para evitar o desencadeamento de fraturas (FONSECA et al., 2014).

Em relação aos componentes da matriz extracelular, a fase inorgânica desta possui alta relação com a resistência óssea e a tenacidade características do tecido (FOLLET et al., 2004; FRATZL et al., 2004). O nível de mineralização é altamente correlacionado ao módulo de elasticidade e a resistência máxima, havendo aumento da carga necessária para ocorrência de fratura e redução da deformação em ossos mais mineralizados (FOLLET et al., 2004; FONSECA et al., 2014).

O grau de mineralização é regulado pelo equilíbrio entre os processos de aposição e reabsorção tecidual (BOIVIN et al., 2000). Na aposição, os osteoblastos produzem e secretam os componentes orgânicos da matriz óssea, que sofrem a mineralização primária. Progressivamente, ocorre a mineralização secundária, na qual há lento acréscimo na quantidade dos minerais depositados, seja em número ou em tamanho dos cristais de hidroxiapatita (GOLUB, 2009). Nas situações em que ocorre aumento na taxa de remodelamento ósseo, a mineralização secundária não acontece de forma adequada, havendo então redução generalizada da mineralização, e por conseguinte, redução da tenacidade (BOIVIN; MEUNIER, 2001, BOIVIN; MEUNIER, 2002a).

A mineralização óssea excessiva também se torna um fator prejudicial às propriedades mecânicas do tecido, uma vez que há aumento no risco do surgimento de fraturas (LENART; LORICH; LANE, 2008; NEVIASER et al., 2008). A redução na reabsorção resulta em acúmulo de matriz antiga e mais mineralizada, o que afeta a biomecânica óssea (BOIVIN; MEUNIER, 2002b). Em primeiro plano, o osso muito mineralizado se torna quebradiço, e com isso tem redução na sua capacidade de absorção de energia, e por consequência, menor capacidade de deformação elástica. Com redução na taxa de deformação elástica, as cargas fisiológicas

associadas à locomoção não são adequadamente dissipadas, havendo desenvolvimento de microtrincas, que gradualmente aumentam de tamanho e resultam em fraturas (CURREY, 1990; MASHIBA et al., 2001).

Sendo assim, é notável que a taxa de remodelamento ósseo balanceada é necessária na manutenção das propriedades biomecânicas teciduais, uma vez que a mineralização adequada proporciona a estrutura que combina tenacidade e fragilidade de forma ideal (FONSECA et al., 2014).

No entanto, ressalta-se que não apenas o grau de mineralização é importante na biomecânica óssea, mas também a qualidade dos cristais de hidroxiapatita, o que envolve características como tamanho e forma. Em animais jovens, a variedade morfológica dos cristais é maior em relação aqueles de idade avançada, os quais apresentam principalmente cristais maiores e homogêneos, o que implica em menor resistência (BOSKEY, 2003). O fato dos cristais de hidroxiapatita se depositarem nos espaços entre as fibrilas colágenas, provavelmente faz com que cristais muito grandes possam causar danos à estrutura do colágeno tipo I, reduzindo assim a resistência das fibras (FRATZL et al., 1991). A disposição geométrica dos cristais, por sua vez, é responsável por cerca de 60% da variação nas propriedades mecânicas ósseas, devido ao fato de que o aumento da cristalinidade é proporcional ao aumento da resistência e tenacidade do osso, de acordo com Yerramshetty e Akkus (2008).

Dessa forma, observa-se que além do grau de mineralização, a forma de disposição dos cristais de hidroxiapatita ao longo das fibras colágenas, bem como sua morfologia, são fatores de grande influência nas propriedades mecânicas ósseas (FONSECA et al., 2014).

2.2 MICROARQUITETURA TECIDUAL

O arranjo espacial apresentado pelo tecido ósseo se firma com um dos fatores de grande influência na resistência mecânica do tecido. O tecido ósseo trabecular ou esponjoso, com superfície de contato mais ampla em relação ao cortical ou compacto, é primariamente afetado em situações de aumento na taxa de reabsorção óssea, uma vez que as trabéculas se tornam progressivamente mais finas e perdem suas conexões, à medida que a reabsorção progride. Quanto mais intensa a taxa de reabsorção osteoclástica, maior se torna a perda de conexão entre as trabéculas em razão do dano à microarquitetura tecidual (BOYD et al., 2006; LAIB et al., 2001; SIU et al., 2004).

Destaca-se que as alterações morfológicas na disposição das trabéculas ósseas influenciam de forma imediata a biomecânica tecidual, sobretudo nas regiões onde o osso

trabecular se faz predominante, como nas epífises ósseas e nos corpos vertebrais (TURNER, 2002).

Como exemplo, Khosla et al. (2005) avaliaram o volume de osso trabecular na região distal do rádio de homens e mulheres de 20 a 90 anos de idade, relatando haver decréscimo de 27% do volume com a idade. Os autores ainda observaram padrões distintos em relação ao gênero, nos quais as mulheres apresentaram maior redução do número de trabéculas, enquanto os homens, por sua vez, demonstraram maior perda de espessura trabecular.

As alterações na arquitetura tecidual secundárias ao envelhecimento, possuem alta taxa de influência sobre os parâmetros biomecânicos ósseos, tanto em humanos, quanto em diversas espécies animais. Borah et al. (2002) demonstraram que as variações no volume trabecular e na microarquitetura tecidual são relacionadas a 91% das variações na resistência de vértebras de suínos às tensões de compressão. Por sua vez, Wehrli et al. (2010), ao estudarem a microarquitetura e volume ósseo trabecular de tíbia e rádio distais de mulheres em pós-menopausa, relatam 96% de influência de tais parâmetros sobre a resistência óssea. Enquanto isso, Chappard et al. (1996) relatam que apenas o volume ósseo trabecular responde por 37 a 67% das variações sobre as propriedades mecânicas ósseas.

Além das alterações relacionadas à idade e ao gênero, a resistência óssea pode ser influenciada pelo histórico de fraturas. Legrand et al. (2000) demonstraram, ao realizar biópsias ósseas de pacientes osteopênicos com ou sem histórico de fraturas, que, aqueles previamente fraturados apresentaram maior taxa de separação de trabéculas ósseas, além de menor índice de conectividade das mesmas.

O aumento da reabsorção óssea também é um fator de forte influência no risco de desenvolvimento de fraturas no tecido ósseo cortical, cujas alterações são capazes de comprometer a resistência mecânica tecidual (BELL et al., 1999). A porosidade do osso cortical é relacionada com redução significativa da tenacidade, além de haver maior sobrecarga no tecido ósseo trabecular à medida que o tecido cortical se tona mais poroso (BURGHARDT et al., 2009).

O sistema de canais de Havers é a principal estrutura afetada pelo aumento do remodelamento ósseo cortical, uma vez que o interior destas estruturas se torna a superfície inicial para ação dos osteoclastos, havendo aumento progressivo no diâmetro dos canais, conforme a reabsorção progride. Por esta razão, o osso cortical se torna mais poroso, e sofre o processo de trabecularização, tornando-se morfologicamente similar ao tecido ósseo trabecular, e inferior em relação à resistência mecânica (COOPER et al., 2007; SIETSEMA, 1995).

O aumento da porosidade do osso cortical é altamente relacionado ao envelhecimento. Nicks et al. (2012) relatam que, apesar de apresentarem densidade mineral óssea similar, indivíduos mais velhos tendem possuir ossos com camada cortical mais porosa. Tais achados permitem inferir que indivíduos com a mesma densidade mineral óssea podem apresentar riscos de fraturas diferenciados, uma vez que a idade altera a arquitetura óssea. A porosidade do osso cortical é inversamente proporcional às propriedades mecânicas ósseas, seja em humanos (DONG; GUO, 2004), ou em animais de laboratório (FONSECA et al., 2011).

Tais observações mostram que as alterações na microarquitetura tecidual, seja no tecido ósseo trabecular ou no cortical, causam variações significativas nas propriedades mecânicas do osso, mesmo que muitas dessas alterações sejam subdiagnosticadas quando se considera apenas a densidade mineral óssea (FONSECA et al., 2014).

2.3 CONFORMAÇÃO ÓSSEA

A conformação geométrica do osso representa importante papel na resistência óssea, sendo que as variações em tamanho e massa óssea são de fundamental influência. Por exemplo, ossos de tamanho maior tendem a ser mais resistentes quando comparados com o mesmo osso em tamanho menor (BOUXSEIN; COAN; LEE, 1999; CHENG et al., 1997; LOCHMÜLLER et al., 2002a, 2002b, 2002c; MULLER; WEBBER; BOUXSEIN, 2003).

Diversas cargas são aplicadas aos ossos constantemente, desde as cargas fisiológicas, como aquelas associadas à locomoção e à contração muscular, ou as não fisiológicas, como as originadas a partir de traumas. Mais comumente, as cargas não fisiológicas são as principais causadoras de fraturas, sendo raros os casos de fraturas ósseas por cargas fisiológicas (HULSE; HYMAN, 2007).

Geralmente, o esqueleto é submetido a cargas de compressão ou tração, havendo momentos de aplicação de cargas de flexão e tração. A resistência a essas duas últimas formas é particularmente importante, visto que, a maioria das fraturas do esqueleto apendicular é relacionada às cargas de flexão ou torção (FONSECA et al., 2014).

A distribuição do tecido ósseo fora do eixo neutro das cargas de torção ou flexão, é uma das formas mais eficientes apresentadas pelo tecido para resistir a esses tipos de tensões. Normalmente, o eixo neutro é a região central do osso longo, a qual comumente possui o canal medular (BOUXSEIN; KARASIK, 2006). A distribuição da massa óssea ao redor do eixo neutro é uma propriedade mensurável, o momento de inércia, cujo valor é proporcional ao

diâmetro do osso considerado. Com isso, qualquer aumento no diâmetro externo do osso longo é capaz de aumentar sua resistência à flexão e torção (TURNER; BURR, 1993).

A resistência à compressão, por sua vez, é intimamente relacionada à área de secção transversal do osso, como ilustrado na Figura 3. Quanto maior a área de secção transversal, mais resistente à compressão se torna o osso, enquanto, mais distante do eixo neutro está distribuído seu tecido, maior sua resistência à torção e flexão (BOUXSEIN; KARASIK, 2006).

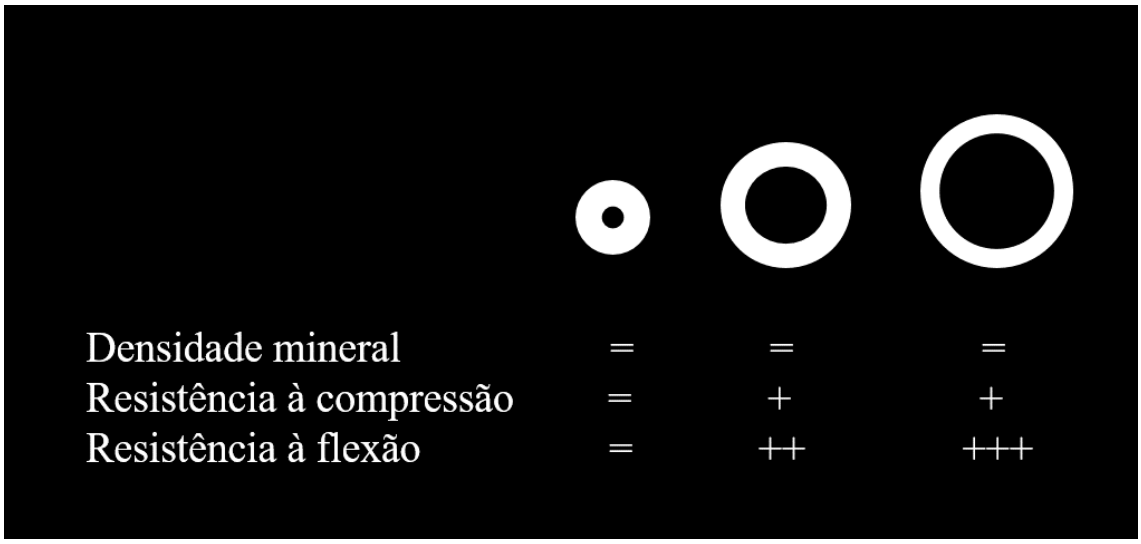

Figura 3 – Esquema do efeito da área de secção transversal e do momento de inércia sobre a resistência óssea.
Fonte: Adaptado de Bouxsein e Karasik (2006).

Devido aos ciclos de remodelamento ósseo, aos poucos, o tecido se torna mais resistente à determinadas cargas, graças ao seu mecanismo de adaptação. O envelhecimento, causa perda tecidual, e por consequência, há redistribuição dos tecidos trabecular e cortical. Essa redistribuição se dá pelos mecanismos de reabsorção e aposição, controladas pelo endósteo e periósteo respectivamente. Com essa dinâmica, o osso longo tem seu diâmetro aumentado de acordo com o envelhecimento, melhorando a resistência às cargas de flexão e torção (RUFF; HAYES, 1982; SEEMAN, 2002; SMITH; WALKER, 1964).

Em relação aos estudos da resistência óssea do fêmur, especificamente, surge outro parâmetro de importância a ser considerado, a geometria do colo femoral. Em humanos, esse fator é importante na comparação da susceptibilidade às fraturas de colo femoral entre grupos étnicos. Nakamura et al. (1994) compararam mulheres caucasianas e japonesas, evidenciando que o risco de desenvolvimento de fraturas do colo femoral nesse último grupo foi menor, em razão da conformação favorável da geometria óssea, mesmo que a massa óssea total fosse menor. O desenvolvimento do colo femoral aumenta o risco de fraturas na região, uma vez que

há mais amplitude da angulação entre o eixo do fêmur e o acetábulo, havendo maior concentração de forças no local (WANG et al., 2009).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado no exposto, pode-se concluir que a resistência mecânica óssea é influenciada por vários fatores intrínsecos ao tecido. A morfologia óssea, a microarquitetura e as propriedades teciduais possuem alta variabilidade entre indivíduos, e por consequência, influenciam as propriedades mecânicas teciduais em diferentes níveis. Tais informações devem ser levadas em consideração ao se estudar a biomecânica óssea, como em experimentações ou na abordagem terapêutica de fraturas, por exemplo.

4 REFERÊNCIAS

ALCOBENDAS, M.; BAUD, C. A.; CASTANET, J. Structural changes of the periosteocytic area in *Vipera aspis* (L.) (Ophidia, Viperidae) bone tissue in various physiological conditions. **Calcified Tissue International**, Berlin, v. 49, n. 1, p. 53–57, 1991.

BELL, K. L. et al. Regional differences in cortical porosity in the fractured femoral neck. **Bone**, New York, v. 24, n. 1, p. 57–64, 1999.

BOIVIN, G. Y. et al. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. **Bone**, New York, v. 27, n. 5, p. 687–694, 2000.

BOIVIN, G.; MEUNIER, P. J. Changes in bone remodeling rate influence the degree of mineralization of bone which is a determinant of bone strength: therapeutic implications. In: MAJUMDAR, S.; BAY, B. K. **Noninvasive assessment of trabecular bone architecture and the competence of bone**. Boston, MA: Springer, 2001. p. 123–127.

BOIVIN, G.; MEUNIER, P. J. Changes in bone remodeling rate influence the degree of mineralization of bone. **Connective Tissue Research**, London, v. 43, n. 2–3, p. 535–537, 2002b.

BOIVIN, G.; MEUNIER, P. J. The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. **Calcified Tissue International**, Berlin, v. 70, n. 6, p. 503–511, 2002a.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 26, n. 2, p. 229–238, 2011.

BONUCCI, E.; GHERARDI, G. Osteocyte ultrastructure in renal osteodystrophy. **Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histology**, Berlin, v. 373, n. 3, p. 213–231, 1977.

BORAH, B. et al. Risedronate preserves trabecular architecture and increases bone strength in vertebra of ovariectomized minipigs as measured by three-dimensional microcomputed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 17, n. 7, p. 1139–1147, 2002.

BOSKEY, A. Bone mineral crystal size. **Osteoporosis International**, London, v. 14, n. 5, p. 16–21, 2003.

BOUXSEIN, M. L. Bone quality: where do we go from here? **Osteoporosis International**, London, v. 14, p. 118–127, 2003.

BOUXSEIN, M. L.; COAN, B. S.; LEE, S. C. Prediction of the strength of the elderly proximal femur by bone mineral density and quantitative ultrasound measurements of the heel and tibia. **Bone**, New York, v. 25, n. 1, p. 49–54, 1999.

BOUXSEIN, M. L.; KARASIK, D. **Bone geometry and skeletal fragility current osteoporosis reports**. Boston, MA: Springer, 2006.

BOYD, S. K. et al. Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by *in vivo* micro-computed tomography. **Bone**, New York, v. 39, n. 4, p. 854–862, 2006.

BURGHARDT, A. J. et al. Age and gender related differences in the geometric properties and biomechanical significance of intra-cortical porosity in the distal radius and tibia. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 25, n. 5, p. 983–993, 2009.

CARDOSO, L. et al. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 24, n. 4, p. 597–605, 2009.

CHAPPARD, D. et al. Altered trabecular architecture induced by corticosteroids: a bone histomorphometric study. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 11, n. 5, p. 676–685, 1996.

CHENG, X. G. et al. Assessment of the strength of proximal femur *in vitro*: relationship to femoral bone mineral density and femoral geometry. **Bone**, New York, v. 20, n. 3, p. 213–218, 1997.

COOPER, D. M. L. et al. Age-dependent change in the 3D structure of cortical porosity at the human femoral midshaft. **Bone**, New York, v. 40, n. 4, p. 957–965, 2007.

CURREY, J. D. Physical characteristics affecting the tensile failure properties of compact bone. **Journal of Biomechanics**, Elmsford, v. 23, n. 8, p. 837–844, 1990.

CURREY, J. D. The mechanical properties of bone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 73, p. 209–231, 1970.

DONG, X. N.; GUO, X. E. The dependence of transversely isotropic elasticity of human femoral cortical bone on porosity. **Journal of Biomechanics**, Elmsford, v. 37, n. 8, p. 1281–1287, 2004.

DUNSTAN, C. R.; SOMERS, N. M.; EVANS, R. A. Osteocyte death and hip fracture. **Calcified Tissue International**, Berlin, v. 53, n. 1, p. S113–S117, 1993.

EINHORN, T. A. Bone strength: the bottom line. **Calcified Tissue International**, Berlin, v. 51, n. 5, p. 333–339, 1992.

FOLLET, H. et al. The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. **Bone**, New York, v. 34, n. 5, p. 783–789, 2004.

FONSECA, H. et al. Voluntary exercise has long-term *in vivo* protective effects on osteocyte viability and bone strength following ovariectomy. **Calcified Tissue International**, Berlin, v. 88, n. 6, p. 443–454, 2011.

FONSECA, H. et al. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. **Sports Medicine**, Auckland, v. 44, n. 1, p. 37–53, 2014.

FRATZL, P. et al. Nucleation and growth of mineral crystals in bone studied by small-angle X-ray scattering. **Calcified Tissue International**, Berlin, v. 48, n. 6, p. 407–413, 1991.

FRATZL, P. et al. Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. **Journal of Materials Chemistry**, United Kingdom, v. 14, n. 14, p. 2115–2123, 2004.

FRIEDMAN, A. W. Important determinants of bone strength. **Journal of Clinical Rheumatology**, Philadelphia, v. 12, n. 2, p. 70–77, 2006.

GOLUB, E. E. Role of matrix vesicles in biomineralization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Amsterdam, v. 1790, n. 12, p. 1592–1598, 2009.

GU, G. et al. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 335, n. 4, p. 1095–1101, 2005.

HALLER, A. C.; ZIMNY, M. L. Effects of hibernation on interradicular alveolar bone. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 56, n. 12, p. 1552–1557, 1977.

HERNANDEZ, C. J.; KEAVENY, T. M. A biomechanical perspective on bone quality. **Bone**, New York, v. 39, n. 6, p. 1173–1181, 2006.

HULSE, D.; HYMAN, B. Biomecânica e biologia das fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, p. 1785–1792, 2007.

KHOSLA, S. et al. Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based noninvasive *in vivo* assessment. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 21, n. 1, p. 124–131, 2005.

KLEIN-NULEND, J. et al. Mechanosensation and transduction in osteocytes. **Bone**, New York, v. 54, n. 2, p. 182–190, 2013.

KOGIANNI, G.; MANN, V.; NOBLE, B. S. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 23, n. 6, p. 915–927, 2008.

KREMPIEN, B. et al. The influence of immobilization on osteocyte morphology - osteocyte differential count and electron microscopical studies. **Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histology**, Berlin, v. 370, n. 1, p. 55–68, 1976.

KURATA, K. et al. Bone marrow cell differentiation induced by mechanically damaged osteocytes in 3D gel-embedded culture. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 21, n. 4, p. 616–625, 2006.

KWIECINSKI, G. G.; KROOK, L.; WIMSATT, W. A. Annual skeletal changes in the little brown bat, *Myotis lucifugus lucifugus*, with particular reference to pregnancy and lactation. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 178, n. 4, p. 410–420, 1987.

LAIB, A. et al. The temporal changes of trabecular architecture in ovariectomized rats assessed by MicroCT. **Osteoporosis International**, London, v. 12, n. 11, p. 936–941, 2001.

LEGRAND, E. et al. Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 15, n. 1, p. 13–19, 2000.

LENART, B. A.; LORICH, D. G.; LANE, J. M. Atypical fractures of the femoral diaphysis in postmenopausal women taking alendronate. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 358, n. 12, p. 1304–1306, 2008.

LOCHMÜLLER, E. M. et al. Mechanical strength of the proximal femur as predicted from geometric and densitometric bone properties at the lower limb versus the distal radius. **Bone**, New York, v. 30, n. 1, p. 207–216, 2002a.

LOCHMÜLLER, E. M. et al. Mechanical strength of the thoracolumbar spine in the elderly: prediction from in situ dual-energy X-ray absorptiometry, quantitative computed tomography (QCT), upper and lower limb peripheral QCT, and quantitative ultrasound. **Bone**, New York, v. 31, n. 1, p. 77–84, 2002b.

LOCHMÜLLER, E. M. et al. Radius bone strength in bending, compression, and falling and its correlation with clinical densitometry at multiple sites. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 17, n. 9, p. 1629–1638, 2002c.

MARKEL, M. D. et al. Mechanical properties of long bones in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 55, n. 8, p. 1178–83, 1994.

MASHIBA, T. et al. Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. **Bone**, New York, v. 28, n. 5, p. 524–531, 2001.

MCCREADIE, B. R. et al. Hierarchical structure of bone and micro-computed tomography. In: MAJUMDAR, S.; BAY, B. K. **Noninvasive assessment of trabecular bone architecture and the competence of bone**. Boston, MA: Springer, 2001. p. 67–83.

MISEREZ, A. et al. The transition from stiff to compliant materials in squid beaks. **Science**, Washington, v. 319, n. 5871, p. 1816–9, 2008.

MULLER, M. E.; WEBBER, C. E.; BOUXSEIN, M. L. Predicting the failure load of the distal radius. **Osteoporosis International**, London, v. 14, n. 4, p. 345–352, 2003.

NAKAMURA, T. et al. Do variations in hip geometry explain differences in hip fracture risk between japanese and white americans? **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 9, n. 7, p. 1071–1076, 1994.

NEVIASER, A. S. et al. Low-energy femoral shaft fractures associated with alendronate use. **Journal of Orthopaedic Trauma**, New York, v. 22, n. 5, p. 346–350, 2008.

NICKS, K. M. et al. Relationship of age to bone microstructure independent of areal bone mineral density. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 27, n. 3, p. 637–644, 2012.

NISHIOKA, R. S. et al. Estudo da ocorrência de micro deformações ao redor de três implantes de hexágono externo, sob a influência da fundição de coifas plásticas e usinadas. **Brazilian Dental Science**, São José dos Campos, v. 13, n. 3/4, p. 15-21, 2011.

QIU, S. et al. Reduced iliac cancellous osteocyte density in patients with osteoporotic vertebral fracture. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 18, n. 9, p. 1657–1663, 2003.

RADASCH, R. M. Biomechanics of bone and fractures. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 29, n. 5, p. 1045–1082, 1999.

RAMP, W. K.; NEUMAN, W. F. Some factors affecting mineralization of bone in tissue culture. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 220, n. 1, p. 270–274, 1971.

RUFF, C. B.; HAYES, W. C. Subperiosteal expansion and cortical remodeling of the human femur and tibia with aging. **Science**, Washington, v. 217, n. 4563, p. 945–948, 1982.

SCHMAEDECKE, A. **Avaliação biomecânica de diferentes bloqueios transcorticais de interlocking nail em relação às forças de torção, encurvamento e axiais atuantes em fraturas diafisárias de fêmur de cães - estudo *in vitro***. 2007. 142 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SEEMAN, E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. **The Lancet**, London, v. 359, n. 9320, p. 1841-1850, 2002.

SEEMAN, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, Tokyo, v. 26, n. 1, p. 1–8, 2008.

SIETSEMA, W. K. Animal models of cortical porosity. **Bone**, New York, v. 17, n. 4, p. S297–S305, 1995.

SIU, W. S. et al. A study of trabecular bones in ovariectomized goats with micro-computed tomography and peripheral quantitative computed tomography. **Bone**, New York, v. 35, n. 1, p. 21–26, 2004.

SMITH, R. W.; WALKER, R. R. Femoral expansion in aging women: implications for osteoporosis and fractures. **Science**, Washington, v. 145, n. 3628, p. 156–157, 1964.

TATSUMI, S. et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 5, n. 6, p. 464–475, 2007.

TAZAWA, K. et al. Osteocytic osteolysis observed in rats to which parathyroid hormone was continuously administered. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, Tokyo, v. 22, n. 6, p. 524–529, 2004.

TETI, A.; ZALLONE, A. Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. **Bone**, New York, v. 44, n. 1, p. 11–16, 2009.

TURNER, C. H. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. **Osteoporosis International**, London, v. 13, n. 2, p. 97–104, 2002.

TURNER, C. H.; BURR, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, New York, v. 14, n. 4, p. 595–608, 1993.

VATSA, A. et al. Bio imaging of intracellular NO production in single bone cells after mechanical stimulation. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 21, n. 11, p. 1722–1728, 2006.

WANG, Q. et al. Women and men with hip fractures have a longer femoral neck moment arm and greater impact load in a sideways fall. **Osteoporosis International**, London, v. 20, n. 7, p. 1151–1156, 2009.

WEHRLI, F. W. et al. Mechanical implications of estrogen supplementation in early postmenopausal women. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 25, n. 6, p. 1406–1414, 2010.

WEINSTEIN, R. S. et al. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. **Aging Cell**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 147–161, 2010.

WILSON, E. E. et al. Three structural roles for water in bone observed by solid-state NMR. **Biophysical Journal**, New York, v. 90, n. 10, p. 3722–3731, 2006.

YERRAMSHETTY, J. S.; AKKUS, O. The associations between mineral crystallinity and the mechanical properties of human cortical bone. **Bone**, New York, v. 42, n. 3, p. 476–482, 2008.

Megaesôfago em cães – revisão de literatura

Caio Vaz Baqui Lima[1]
Jorge Luiz Rizzo Gervais[2]
Letícia Parmanhani Romão[3]
Thaís Gonçalves Tavares[4]
Jankerle Neves Boeloni[5]

[1] Médico Veterinário Autônomo, e-mail: caiobaqui@hotmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jorluiz1998@gmail.com
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: leticiaparmanhani@gmail.com
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: thastavares@yahoo.com.br
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jankerle@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Distúrbios do trato digestivo são comuns em cães e em sua maioria apresentam prognósticos positivos. No entanto, algumas alterações dependem um pouco mais de atenção por parte dos clínicos, principalmente pelo alto grau de complexidade e por exigirem uma abordagem multifatorial para o sucesso terapêutico, como é o caso do megaesôfago (NELSON; COUTO, 2015; PENDERIS; MARTIN-VANQUERO, 2016).

O megaesôfago trata-se de uma alteração estrutural do esôfago de caráter congênito ou adquirido, sendo importante salientar que cada paciente irá apresentar suas características individuais e, portanto, irá cursar a doença de maneira diferente. Por esse motivo o conhecimento profundo a respeito do megaesôfago e suas particularidades, se faz necessário tanto por parte de tutores, como por parte dos médicos veterinários, a fim de se obter resultados positivos na abordagem terapêutica desses pacientes (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2015; NELSON; COUTO, 2015).

Sendo assim, o presente capítulo tem como objetivo compilar informações relevantes como etiopatogenia, achados clínicos, diagnóstico e abordagens terapêuticas do megaesôfago em cães, com o intuito de informar e consequentemente capacitar os profissionais para melhor abordagem dos pacientes acometidos por essa enfermidade.

2 ETIOPATOGENIA DO MEGAESÔFAGO

O megaesôfago é uma doença caracterizada por dilatação esofágica (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2015), atonia e flacidez devido a distúrbio de motilidade, decorrentes de disfunção motora segmentar ou difusa (GUEDES et al., 2016). Essa doença afeta os nervos aferentes e eferentes responsáveis pela motilidade esofágica, sendo as vias aferentes compostas pelo nervo vago e seus ramos (MARTÍN, 2012).

Como consequência do megaesôfago há dificuldade para que o conteúdo alimentar seja levado para o estômago, originando acúmulo de alimento no lúmen esofágico, causando esofagites, regurgitação, pneumonia aspirativa e rompimento esofágico (GUEDES et al., 2016).

O megaesôfago pode ser classificado de duas maneiras: levando em consideração o momento em que a doença se desenvolveu (congênito ou adquirido) ou de acordo com sua etiologia (idiopático, primário ou secundário) (WASHABAU, 2004).

A forma congênita geralmente é identificada em filhotes após o desmame sendo observado regurgitação e subdesenvolvimento (FREITAS et al., 2019; WASHABAU, 2004),

por esse motivo, o histórico e a idade ajudam na diferenciação em relação à forma adquirida. A etiologia do megaesôfago congênito ainda é pouco elucidada, podendo estar relacionado a lesões funcionais nos neurônios motores superiores do centro da deglutição ou no ramo sensorial aferente do arco reflexo que regula o peristaltismo esofágico (GUEDES et al., 2016). As raças de cães como Pastor-alemão, Labrador, Golden Retriever, Setter Irlandês, Greyhound, Shar-pei e Dogue-alemão apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de megaesôfago congênito (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2015).

Com relação à forma adquirida da doença, pode acontecer em cães tanto de raças puras quanto mestiças e ocorre com maior frequência em animais acima de 8 anos de idade. Entretanto, pode acometer também cães mais jovens (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2015). Essa forma tem como principais sinais clínicos a regurgitação e a perda de peso (MARTÍN, 2012; TANAKA et al., 2010).

A forma adquirida pode ser idiopática ou ocorrer em decorrência de obstrução física parcial ou total, estenose e persistência do arco aórtico direito. Geralmente, acomete o segmento imediatamente cranial ao local obstruído ou estenosado. Na maioria dos casos, a dilatação ocorre cranialmente ao estômago, exceto quando é causado pela persistência do arco aórtico direito, uma vez que, nesse caso, a dilatação acontece cranialmente ao coração, visto que o anel vascular que oblitera o esôfago está na altura do coração (GUEDES et al., 2016).

O megaesôfago adquirido também pode ocorrer devido a outras doenças concomitantes como miastenia gravis, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Chagas, hipotireoidismo (GUEDES et al., 2016), hiperadrenocorticismo, polineurite e polimiosite (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2015). E, dentre essas doenças citadas, a mais relatada é a miastenia gravis que se caracteriza pela diminuição dos receptores pós-sinápticos de acetilcolina na junção neuromuscular, nesse caso, dos músculos esofágicos (ANDRADE et al., 2007; TORRES et al., 2018). Neste contexto, um estudo atual avaliou 99 casos de megaesôfago em cães e apontou que a maioria dos casos (89 casos) foram adquiridos, sendo 42,7% idiopáticos e 38,2% associados à miastenia gravis. Ressalta ainda, a importância de determinar a etiologia precisa da doença para um tratamento estratégico e melhor prognóstico para os pacientes acometidos (GOMES et al., 2020).

Outra doença relatada associada ao megaesôfago é o botulismo, causado por toxinas produzidas pela bactéria *Clostridium botulinum*, onde as formas de contaminação em cães incluem ingestão de alimentos deteriorados e carcaças de outros animais contaminadas e, depois de ingerida, a toxina atua na junção neuromuscular impedindo a liberação do neurotransmissor acetilcolina acometendo principalmente os nervos periféricos (GONÇALVES et al., 2019),

dentre eles os que atuam na musculatura esofágica, causando uma paralisia flácida e consequente megaesôfago (FIORATO et al., 2016).

Estudos recentes em cães indicam novas causas relacionadas ao megaesôfago secundário. Como exemplo tem-se a overdose de fármacos como a vincristina que foi relatada em um cão durante o tratamento quimioterápico para linfoma multicêntrico. Nesse caso, destaca-se a importância do cuidado com a dose e concentração do fármaco durante sua administração (CHAE et al., 2019). Outro exemplo é a afecção parasitária por *Spirocerca lupi*, onde a forma adulta pode causar granulomas na parede do esôfago causando estenose do lúmen e consequentemente uma dilatação cranial ao segmento estenosado, caracterizando o quadro de megaesôfago (LIGNON et al., 2020).

3 ACHADOS CLÍNICOS EM INDIVÍDUOS COM MEGAESÔFAGO

Durante a anamnese, os principais sinais relatados são regurgitação, perda de massa corporal pela dificuldade na ingestão de alimentos e tosse e/ou hipertermia secundárias. Eventualmente, tem-se descrição apenas de tosse como queixa principal (NELSON; COUTO, 2015). Além disso, paresia ou paralisia, fraqueza, dor ou depressão e náusea também podem ser elencadas (ANDRADE et al., 2007). Cabe salientar que durante a anamnese, por vezes o responsável pelo animal utiliza o termo vômito como sinônimo de regurgitação, cabendo ao veterinário a diferenciação entre essas duas terminologias (TABELA 1) (TILLEY; JUNIOR, 2015).

Tabela 1 – Características para diferenciação entre vômito e regurgitação.

Vômito	Regurgitação
- Processo ativo, geralmente com contrações abdominais vigorosas;	- Processo passivo. Às vezes, quase sem esforço de expulsão do conteúdo esofágico;
- Sinais premonitórios pronunciados que incluem ptialismo, prostração, deglutição, lamber os lábios e taquicardia;	- Poucos sinais premonitórios adicionais, exceto o ptialismo na doença inflamatória ou obstrutiva do esôfago;
- Sem consistência definida. A característica da bile varia de acordo com os alimentos digeridos, sangue e muco. Pode conter grama.	- O material alimentar semi-formado é geralmente observado no conteúdo expelido e pode apresentar odor de matéria fermentada. Frequentemente contém muco ou saliva. A presença de sangue é rara e não é observada bile.
- O pH do conteúdo gástrico é variável, portanto não é um indicador confiável.	- O pH do conteúdo é variável, portanto não é um indicador confiável.

Fonte: Colin (2003).

No exame físico, eventualmente é possível observar dilatação sutil no terço médio do pescoço do animal na face ventral (GONÇALVES; VIANNA; ANDRADE, 2019) e durante a ausculta torácica pode-se identificar crepitações pulmonares. A inspeção da cavidade oral pode detectar fragmentos de alimentos acumulados e/ou grande quantidade de saliva espessa na faringe (TAMS, 2003), assim como ptialismo e halitose (TILLEY; JUNIOR, 2015).

É importante enfatizar que nem todos os animais irão apresentar sinais clínicos equivalentes ao grau de disfunção esofágica. Alguns indivíduos podem cursar a doença por longos períodos (semanas a meses), apresentarem dilatação esofágica acentuada no exame radiográfico, porém com episódios de regurgitação de baixa regularidade. Em contrapartida, alguns animais podem manifestar episódios frequentes de regurgitação, contudo, com exames radiográficos apontando graus leves de dilatação esofágica (TAMS, 2003).

Ainda durante o exame físico a manobra de Valsalva pode ser realizada. Esta consiste no fechamento manual do focinho e da boca, enquanto o tórax é comprimido. Com isso, a pressão intratorácica aumenta provocando frequentemente um abaulamento no lado esquerdo do pescoço, devido a dilatação do esôfago cervical (TAMS, 2003). No entanto, é possível que não seja observada dilatação do esôfago cervical durante o exame físico, uma vez que alguns pacientes apresentam dilatação apenas nos segmentos intratorácicos (MARTINS, 2013).

4 DIAGNÓSTICO DO MEGAESÔFAGO

O diagnóstico de megaesôfago inicia-se com anamnese e exame clínico rigorosos, atentando principalmente para alterações na cavidade oral, região cervical e região torácica (SPILLMANN, 2007). É comum que a regurgitação pós-prandial diária, a dificuldade em deglutir e a apatia estejam dentre as principais queixas dos tutores (ALVES et al., 2013; ANDRADE et al., 2007; RAMOS et al., 2018; TORRES et al., 2018).

As principais ferramentas diagnósticas disponíveis para o diagnóstico do megaesôfago são radiografia simples ou contrastada (ALVES et al., 2013; RAMOS et al., 2018), endoscopia (RAMOS et al., 2018; SPILLMANN, 2007), ressonância magnética e algumas modalidades de exames laboratoriais como hemograma completo e exames de bioquímica sérica (NELSON; COUTO, 2015).

Em geral, o raio-x é um dos primeiros exames de imagem a serem solicitados para o diagnóstico de megaesôfago. Na radiografia simples, por vezes, é possível visualizar a dilatação dos segmentos esofágicos. No entanto, essa modalidade de imagem não é a ideal para a avaliação da motilidade e eventualmente não possibilita a identificação de alguns corpos

estranhos, dependendo da sua natureza. Nesses casos, recomenda-se a realização da radiografia contrastada com sulfato de bário para a obtenção de diagnóstico mais preciso (ALVES et al., 2013; RAMOS et al., 2018).

Em algumas situações, a endoscopia pode auxiliar no diagnóstico, sendo ideal para diagnosticar alterações na mucosa esofágica, como esofagite, e visualizar estenoses que não foram diagnosticadas em exames de raio-x (RAMOS et al., 2018; SPILLMANN, 2007). No entanto, os efeitos secundários à anestesia são fatores a serem considerados no momento da realização do exame, pois estes podem provocar o relaxamento da musculatura esofágica e induzir ao diagnóstico errôneo de megaesôfago (SPILLMANN, 2007). Por isso, é necessário nos casos de suspeita de megaesôfago, a realização prévia de um exame radiográfico antes de realizar a endoscopia (RAMOS et al., 2018).

A ressonância magnética também pode ser útil na identificação de alterações esofágicas. Esta modalidade de imagem é excelente para a avaliação de alterações em tecidos moles (NELSON; COUTO, 2015).

Em casos de megaesôfago congênito, para o diagnóstico categórico é necessário associar a idade e raça do animal com a exclusão das suspeitas (se existir) de megaesôfago adquirido (ALVES et al., 2013; NELSON; COUTO, 2015).

No caso de suspeita de megaesôfago secundário/adquirido, os exames laboratoriais são indispensáveis para o diagnóstico exato e posteriormente o tratamento efetivo. O hemograma e os perfis bioquímicos são exames laboratoriais básicos para iniciar a busca pela causa do megaesôfago (ANDRADE et al., 2007; RAMOS et al., 2018; TORRES et al., 2018). A leucocitose observada no hemograma pode ser indicativa de pneumonia aspirativa, sendo recomendada a interpretação conjunta ao exame de radiografia torácica (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2015). Outras modalidades de exames relevantes para o diagnóstico encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Outras modalidades de exames para auxílio no diagnóstico de megaesôfago e suas recomendações de uso.

Técnica	Recomendações de uso
- Dosagem de creatinoquinase (CK) e aspartato transaminase (AST)	- Recomendada para pacientes com suspeita de megaesôfago secundário à polimiosite.
- Titulação de anticorpos contra receptores de acetilcolina	- Recomendada para pacientes com suspeita de megaesôfago secundário à miastenia gravis.
- Dosagem de cortisol sérico em repouso	- Recomendada para pacientes com suspeita de megaesôfago secundário à hipoadrenocorticismo. Essa técnica é recomendada mesmo que o paciente esteja com o sódio e potássio em concentrações séricas normais, pois em alguns raros casos pode haver hipoadrenocorticismo com sódio e potássio em concentrações normais.
- Eletromiografia	- Recomendada para pacientes com suspeita de megaesôfago secundário à doença muscular generalizada ou neuropatia.
- Dosagem sérica de T4 (tiroxina) livre e TSH (hormônio estimulante da tireóide)	- Recomendada para pacientes com suspeita de megaesôfago secundário à hipotireoidismo (apesar de raro, o hipotireoidismo pode levar à alterações esofágicas).

Fonte: Nelson e Couto (2015).

5 ABORDAGEM TERAPÊUTICA DO MEGAESÔFAGO

Em geral, não há um tratamento específico estabelecido para pacientes acometidos por megaesôfago. O protocolo deverá levar em consideração a etiologia, tratando a causa de base quando existente, e o grau em que a doença se encontra (NELSON; COUTO, 2015). Três pilares importantes na abordagem de afecções esofágicas são o manejo da esofagite, da pneumonia aspirativa e do déficit nutricional (RADLINSKY, 2015).

5.1 ABORDAGEM CLÍNICA

5.1.1 Manejo da esofagite

É comum que pacientes portadores de megaesôfago apresentem algum grau de esofagite associada, sendo assim, o emprego de terapias medicamentosas para a redução dos danos à mucosa é fundamental na abordagem desses animais (NELSON; COUTO, 2015;

RADLINSKY, 2015). As opções de medicamentos disponíveis para o controle de esofagite em cães estão adaptadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Categorias, respectivos medicamentos indicados para o tratamento de esofagite e os mecanismos de ação em cães.

Categoria: medicamentos	**Ação**
- Antiácidos: Hidróxido de alumínio (MARKS et al., 2018); Hidróxido de magnésio (RADLINSKY, 2015).	- Reduzem a acidez gástrica (MARKS et al., 2018).
- Antagonistas de receptores H_2: Cimetidina (MARKS et al., 2018); Ranitidina (MARKS et al., 2018); Nizatidina (NELSON; COUTO, 2015); Famotidina (MARKS et al., 2018; RADLINSKY, 2015).	- Ação de reduzir a secreção do ácido gástrico por bloquearem os receptores H_2 das células parietais. Eficácia menor em comparação aos inibidores da bomba de prótons (NELSON; COUTO, 2015).
- Inibidores da bomba de prótons: Omeprazol (RADLINSKY, 2015); Esomeprazol (RADLINSKY, 2015); Pantoprazol (RADLINSKY, 2015); Lansoprazol (NELSON; COUTO, 2015); Dexlansoprazol (NELSON; COUTO, 2015).	- Reduzem a acidez gástrica e apresentam ação superior ao dos antagonistas de receptores H_2 (NELSON; COUTO, 2015).
- Procinéticos: Metoclopramida (RADLINSKY, 2015); Cisaprida (RADLINSKY, 2015.)	- Promovem o esvaziamento gástrico, sendo a cisaprida considerada mais eficaz do que a metoclopramida (MARKS et al., 2018).
- Citoprotetor: Sucralfato (NELSON; COUTO, 2015).	- Ação aderente à mucosa lesionada promovendo proteção local (RADLINSKY, 2015).

Fonte: Marks et al. (2018); Nelson e Couto (2015) e Radlinsky (2015).

5.1.2 Manejo da pneumonia aspirativa

Como mencionado anteriormente, dentre os sinais clínicos mais comuns encontrados em pacientes com megaesôfago estão os episódios recorrentes de regurgitação. Devido à proximidade anatômica do esôfago e da traqueia, eventualmente parte do conteúdo regurgitado é acidentalmente aspirado para as vias aéreas, levando o paciente a desenvolver sucessivas pneumonias aspirativas ao longo da vida. É comum que essa complicação seja a responsável pelo óbito desses pacientes e, por isso, sua ocorrência deve ser acompanhada de forma rigorosa

(LAPPIN et al., 2017; NELSON; COUTO, 2015). As recomendações para a abordagem terapêutica da pneumonia aspirativa em cães estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Abordagem terapêutica da pneumonia aspirativa em cães de acordo com as recomendações do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (*ACVIM*).

Passos	Descrição
Passo 1 – Escolha do antibiótico	- O clínico deve, sempre que possível, realizar cultura e antibiograma para auxiliar na escolha do antibiótico mais adequado para seu paciente. No entanto, recomenda-se que a antibioticoterapia empírica seja instituída até que os resultados sejam liberados. A doxiciclina parece se mostrar uma boa opção para uso empírico em pacientes que não apresentem sinais sistêmicos como febre, prostração, desidratação ou insuficiência respiratória. Outras sugestões seriam a penicilina, ampicilina e amoxicilina.
Passo 2 – Vias de administração	- Sempre que o paciente estiver hospitalizado, recomenda-se que a antibioticoterapia seja realizada preferencialmente por via intravenosa, independente do grau de severidade da pneumonia. A antibioticoterapia deve ser mantida por via oral, quando o paciente for liberado para continuidade do tratamento em domicilio.
Passo 3 – Casos de sepse	- Nos pacientes em que a pneumonia evolui para quadro de sepse, é recomendado o uso intravenoso inicial de marbofloxacino ou enrofloxacino em associação com antibiótico de amplo espectro com ação sobre bactérias anaeróbicas e gram positivas (p. ex. clindamicina ou ampicilina), até que se obtenha o resultado do antibiograma. Observação: o clínico deverá sempre se atentar ao uso de antibióticos contra os quais já existe muita resistência bacteriana na região geográfica e ao uso anterior de antibióticos pelo seu paciente.
Passo 4 – Cultura e antibiograma indisponíveis	- Nos casos onde não é possível realizar cultura e antibiograma, o tratamento para casa deverá ser mantido de preferência com os mesmos antibióticos escolhidos inicialmente de forma empírica. O monitoramento da eficácia do tratamento deverá ser acompanhado de acordo com a clínica do paciente.
Passo 5 – Duração do tratamento e monitoramento	- Apesar de mais estudos serem necessários, recomenda-se que o tratamento seja instituído por quatro a seis semanas, apesar de alguns casos necessitarem de períodos terapêuticos mais prolongados. Quando o clínico optar por tratamentos mais curtos, a reavaliação hematológica e radiográfica do paciente deverá ser realizada no período de 10 a 14 dias, para que o mesmo decida se haverá necessidade de prolongamento do tratamento.

Fonte: Lappin et al. (2017).

No tratamento suporte do paciente com pneumonia aspirativa, é recomendada a troca de decúbito a cada duas a quatro horas com o intuito de evitar edema pulmonar hipoestático e agravamento das lesões já instaladas. Os antibióticos a serem selecionados para o tratamento

não devem influenciar no funcionamento normal da junção neuromuscular e cessões de nebulização com tapotagem tendem a auxiliar na recuperação. Casos severos podem necessitar de suporte ventilatório e cuidados intensivos (PENDERIS; MARTIN-VANQUERO, 2016).

5.1.3 Manejo do déficit nutricional e hidroeletrolítico

A perda de peso e o desequilíbrio hidroeletrolítico em decorrência da ineficiência na condução dos alimentos da cavidade oral até o estômago, são problemas frequentes na rotina de pacientes com megaesôfago. Por essa razão, faz-se necessário acompanhamento seriado e manejo nutricional eficaz para a correção e prevenção desses distúrbios (PENDERIS; MARTIN-VANQUERO, 2016).

Para a manutenção do peso corporal do paciente é recomendado que o clínico inicialmente determine o requerimento energético em repouso (RER) que esse paciente necessitará ingerir diariamente (THATCHER; HAND; REMILLARD, 2000). Para isso, existem diversas opções de fórmulas matemáticas e a mais consagrada para cães é a seguinte:

$$\text{RER em Kcal/dia} = (1 \text{ a } 1{,}8) \times 70 \times (\text{Peso corporal})^{0{,}75}$$

(THATCHER; HAND; REMILLARD, 2000).

No entanto, é possível que durante o período em que o estômago recebeu uma quantidade menor de alimento, a câmara gástrica tenha sofrido uma redução no seu tamanho. Sendo assim, a reposição gradual da alimentação deve ser realizada com alimentos pastosos e hipercalóricos, a fim de se evitar sobrecarga estomacal. Para isso, recomenda-se que no primeiro dia, seja oferecido apenas 1/3 do volume calculado para alimentação diária. Esse volume deverá ser gradualmente aumentado de acordo com a resposta do animal, até que o volume total diário necessário seja suportado. Caso necessário, o paciente deverá ser submetido à fluidoterapia preferencialmente intravenosa para correção hidroeletrolítica (PENDERIS; MARTIN-VANQUERO, 2016; THATCHER; HAND; REMILLARD, 2000).

Em decorrência da redução do tônus muscular esofágico, é fortemente recomendado que animais com megaesôfago sejam alimentados em posição bipedal, a fim de fazer com que a gravidade colabore para a chegada dos alimentos e da água até o estômago. Para isto, algumas maneiras de alimentação elevada foram desenvolvidas, como o fornecimento de alimento sobre superfície elevada (FIGURA 1) e a cadeira de Bailey (“Bailey Chair”). Recomenda-se que o

animal permaneça em posição bipedal e/ou com a cabeça elevada por cerca de 10 a 15 minutos após a alimentação (PENDERIS; MARTIN-VANQUERO, 2016).

Figura 1 – Imagem representativa de cão em posição bipedal recebendo alimentação elevada, facilitando a chegada do alimento até estômago por gravidade.
Fonte: Os autores.

Pacientes que não se adaptam ao manejo dietético descrito, podem necessitar de abordagens mais invasivas, como a colocação de sondas nasogástricas, esofágicas ou preferencialmente de tubos gástricos. Dentre as vantagens deste último está a redução da ocorrência de pneumonias aspirativas e o fato de não ser necessária a alimentação bipedal ou elevação da cabeça após o fornecimento do alimento pelo tubo. Dentre as principais desvantagens está a necessidade de procedimento cirúrgico/anestésico, assim como a impossibilidade do fornecimento de alimentos sólidos (PENDERIS; MARTIN-VANQUERO, 2016).

5.2 ABORDAGEM CIRÚRGICA DO PACIENTE COM MEGAESÔFAGO

A abordagem cirúrgica para a correção do megaesôfago ainda não é uma realidade na rotina da medicina veterinária. Apesar de não existirem propostas curativas, em grande parte dos casos a abordagem clínica consegue proporcionar melhora da qualidade de vida e prolongamento da expectativa de vida (NELSON; COUTO, 2015).

Apesar do acesso cirúrgico para procedimentos esofágicos ser considerado de certa forma desafiador, alguns processos patológicos já possuem propostas para abordagem cirúrgica. Dentre eles encontram-se a remoção de corpos estranhos/tumores, perfurações, hérnia

de hiato, fístulas, intussuscepção gastroesofágica, divertículos, acalasia cricofaríngea e estenoses esofágicas (RADLINSKY, 2015).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em decorrência da ampla ponderação realizada, é importante ressaltar que, alguns aspectos sobre a etiopatogenia do megaesôfago ainda permanecem obscuros. Além disso, como em diversas outras doenças crônicas, apesar da cura do megaesôfago ser uma possibilidade remota, é de responsabilidade do clínico a busca por conhecimento sólido a respeito da doença que o permita optar pelas melhores modalidades de diagnóstico e tratamento para essa doença, levando sempre em consideração a necessidade individual de cada paciente.

Espera-se que futuramente novas técnicas cirúrgicas sejam desenvolvidas para possibilitarem a correção anatômica de pacientes com megaesôfago. Isso irá proporcionar a melhora da qualidade de vida, prolongar a expectativa de vida e reduzir os custos investidos pelos tutores em medicamentos, procedimentos, exames médicos e hospitalização.

7 REFERÊNCIAS

ALVES, N. M. et al. Megaesôfago congênito em cão. **Pubvet**, Londrina, v. 7, n. 23, p. 2327-2445, 2013.

ANDRADE, S. F. et al. Megaesôfago secundário à miastenia grave em uma cadela da raça Pastor Alemão. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 477-482, 2007.

CHAE, M. et al. Acquired megaesophagus associated with accidental overdose of vincristine in a dog. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 39, n. 2, p. 320-322, 2019.

COLIN, F. B. Gastrointestinal disorders: part 2 - esophagus. In: SCHAER, M. **Clinical medicine of the dog and cat**. 2. ed. London: Manson Publishing Ltd, 2003. p. 271.

FIORATO, C. A. et al. Botulismo em cão atendido no hospital veterinário da Universidade Estadual de Maringá: relato de caso. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, Paraná, v. 3, n. 1, p. 70-74, 2016.

FREITAS, V. M. L. et al. Cardioplastia esôfago diafragmática em filhote de cão com megaesôfago congênito. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v. 1, n. 1, p. 107, 2019.

GOMES, S. A. et al. Canine nonstructural megaesophagus as a clinical sign of potential neurological disease: 99 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, South Bend, v. 56, n. 1, p. 7-16, 2020.

GONÇALVES, B. A. L.; VIANNA, L. R.; ANDRADE, C. de. C. Terapia neural no tratamento do megaesôfago congênito em cão: relato de caso. **Pubvet**, Curitiba, v. 13, n.9, p. 1-6, 2019.

GONÇALVES, S. R. F. et al. Botulismo em cão sem raça definida - relato de caso. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Pernambuco, v. 13, n. 3, p. 325-328, 2019.

GUEDES, R. M. C. et al. Sistema digestório. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 102.

JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015.

LAPPIN, M. R. et al. Antimicrobial use guidelines for treatment of respiratory tract disease in dogs and cats: antimicrobial guidelines working group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 31, n. 2, p. 279-294, 2017.

LIGNON, J. S. et al. *Spirocerca lupi* (Spirurida: Spirocercidae) infection associated to secondary megaesophagus and obstructive process in a senile dog. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 20-24, 2020.

MARKS, S. L. et al. ACVIM consensus statement: support for rational administration of gastrointestinal protectants to dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 32, n. 6, p. 1823-1840, 2018.

MARTÍN, F. M. Megaesófago en la especie canina: abordaje según los principios de la medicina veterinaria tradicional China y la acupuntura. **Revista Internacional de Acupuntura**, Barcelona, v. 6, n. 4, p. 158-161, 2012.

MARTINS, R. E. **Miastenia grave adquirida em cães**. 2013. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

NELSON, R.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 5. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

PENDERIS, J.; MARTIN-VANQUERO, P. Junctinopathies: disorders of the neuromuscular junction. In: DEWEY, C. W; COSTA, R. C. **Practical guide to canine and feline neurology**. 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons inc, 2016. p. 531-532.

RADLINSKY, M. A. G. Cirurgia do sistema digestório. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 4. ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 427-430.

RAMOS, M. C. et al. Diagnóstico de estenose esofágica parcial em um cão. **Science and Animal Health**, Pelotas, v. 6, n. 2, p. 122-128, 2018.

SPILLMANN, T. Esophageal diseases: diagnostic and therapeutic approach. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 32, 2007, Sydney. **Anais...** Sydney: Wsava Congress, 2007.

TAMS, T. R. Diseases of the esophagus. In:_____. **Handbook of small animal gastroenterology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2003. p. 123.

TANAKA, N. M. et al. Megaesôfago em cães. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, Curitiba, v. 8, n. 3, p. 271-279, 2010.

THATCHER, C. D.; HAND, M. S.; REMILLARD, R. L. Nutrición clínica en pequeños animales: un proceso repetitivo. In: HAND, M. S. et al. **Nutrición clínica en pequeños animales (Small animal clinical nutrition)**. 4. ed. Argentina: Mark Morris Institute, 2000. p. 1-22.

TILLEY, L. P.; JUNIOR, F. W. K. **Consulta veterinária em 5 minutos: espécies canina e felina**. 5. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2015.

TORRES, M. L. M. et al. Megaesôfago secundário à miastenia gravis: relato de caso em um cão. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 16, n. 3, p. 52-58, 2018.

WASHABAU, R. J. Doenças do esôfago. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e gato.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1205-1214.

Neoplasias da cavidade nasal e seios paranasais em animais domésticos: aspectos anatomopatológicos

Alana Camargo Poncio[1]
Théo Matos Arantes Moraes[2]
Jankerle Neves Boeloni[3]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: alana_cp2@hotmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: theomatos@yahoo.com.br
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jankerle@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias primárias da cavidade nasal e região paranasal em animais domésticos apresentam baixa frequência de ocorrência (CASWELL; WILLIAMS, 2016; SANTOS; GUEDES, 2016), exceto o tumor etmoidal enzoótico em ruminantes (SANTOS; GUEDES, 2016). Além disso, de maneira geral a maioria das neoplasias da cavidade nasal são malignas (LÓPEZ, 2009), sendo que 80% dos tumores nasais em cães são malignos (WILSON; DUNGWORTH, 2002) e 92% em gatos (FORMIGHIERI et al., 2012).

Diversas neoplasias podem ocorrer na cavidade nasal e região paranasal de animais domésticos e podem ser subdivididas em epiteliais, mesenquimais, outros tumores e lesões semelhantes a tumores (WILSON, 2017), sendo que em cães 60 a 75% são de origem epitelial (DALECK; DENARDI; RODASKI, 2009).

O diagnóstico pode ser feito utilizando exames de imagem como radiografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética e rinoscopia, porém a análise histopatológica se torna indispensável para a confirmação do diagnóstico (KUEHN, 2006; POWNDER; ROSE; CRAWFORD, 2006).

Assim, objetiva-se com o presente trabalho fazer uma revisão de literatura referente as neoplasias da cavidade nasal e seios paranasais, enfocando principalmente os aspectos anatomopatológicos.

2 CLASSIFICAÇÃO GERAL

Os tumores que acometem a cavidade nasal e região paranasal nos animais domésticos são classificados em epiteliais, mesenquimais, outros tumores e lesões semelhantes a tumores (CASWELL; WILLIAMS, 2016).

2.1 NEOPLASIAS EPITELIAIS

2.1.1 Carcinoma de células escamosas

O carcinoma de células escamosas (CCE), também denominado carcinoma espinocelular e carcinoma epidermoide, é considerado uma neoplasia maligna de origem epitelial derivada do epitélio escamoso estratificado. Tem característica de ser localmente invasivo e ter baixo potencial metastático sistêmico (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002).

Em gatos é a neoplasia mais comum na cavidade nasal e em equinos é a neoplasia nasal de maior frequência (SANTOS; GUEDES, 2016).

Macroscopicamente, tem caráter infiltrativo, consistência friável e pode ser ulcerado (MARIANI et al., 2017). Microscopicamente, os queratinócitos neoplásicos são grandes, pleomórficos, apresentam citoplasma abundante eosinofílico, núcleos pálidos, com um ou dois nucléolos evidentes e elevado número de mitoses (WILSON, 2017). Geralmente são semelhantes aos observados em outros órgãos (CASWELL; WILLIAMS, 2016) com a exceção de serem pouco queratinizados (WILSON, 2017).

2.1.2 Carcinoma transicional

O carcinoma transicional é originário do epitélio transicional da cavidade nasal e tem essa denominação pois as células cuboides não queratinizadas lembram o epitélio de transição do trato urinário (WILSON, 2017). No entanto, não apresenta nenhuma relação com o epitélio de transição do sistema urinário (STÜNZI; HAUSER, 1976). Dentre as neoplasias malignas de origem epitelial que acometem os seios nasais de cão, o carcinoma transicional é considerado o segundo em frequência de ocorrência (PAIVA et al., 2013),

À macroscopia, apresentam caráter invasivo local, no entanto, metástases são raramente observadas (HENDRIX; GELATT, 2000).

Histologicamente, possui arranjo de células em paliçada que é característico deste tumor (WILSON, 2017), sendo considerado um tipo intermediário de tumor entre carcinoma de células escamosas e carcinoma indiferenciado (STÜNZI; HAUSER, 1976). As células neoplásicas são cuboidais a poliédricas com moderado citoplasma claro, núcleo com cromatina pontilhada e um a dois nucléolos proeminentes. No entanto, desmoplasia, atipia celular e figuras de mitose são alterações pouco frequentes (WILSON, 2017).

2.1.3 Adenocarcinoma

Os adenocarcinomas são neoplasias malignas do epitélio glandular de caráter invasivo e que provocam alterações severas nos tecidos adjacentes (WILSON; DUNGWORTH, 2002).

Os adenocarcinomas, à microscopia, apresentam estruturas glandulares que normalmente contém produtos secretórios e são subclassificados em papilar, tubulopapilar, acinar ou padrão misto. As neoplasias de baixo grau formam espaços glandulares ou projeções papilares delineadas por uma única camada de células cuboidais ou colunares e, às vezes, com

aparência pseudoestratificada. Os núcleos são redondos a ovais, nucléolos imperceptíveis, há discreta atipia e raras mitoses. As neoplasias de alto grau se organizam em espaços glandulares irregulares e frequentemente áreas sólidas, além de apresentarem pleomosfismo celular, atipia nuclear e alto índice mitótico (WILSON, 2017).

2.1.4 Tumor etmoidal enzoótico

O tumor etmoidal enzoótico é um tumor maligno denominado histologicamente como adenocarcinoma. Ocorre em ovinos, caprinos e bovinos e origina-se na mucosa olfatória da região etmoidal, particularmente de células epiteliais secretoras das glândulas serosas da mucosa (SANTOS; GUEDES, 2016).

Esta neoplasia é causada por retrovírus espécie específicos (ENTV-1 ovino ou ENTV-2 caprino) que frequentemente apresentam coinfecção com o retrovírus do adenocarcinoma pulmonar ovino (WILSON, 2017).

Os sinais clínicos de maior frequência são tosse, espirros, dificuldade respiratória, alopecia e despigmentação ao redor das narinas devido a descarga nasal crônica, além de anorexia e perda progressiva de peso (SVARA et al., 2006).

Macroscopicamente, são unilaterais ou bilaterais, polipoides ou massas confluentes na região etmoidal, friáveis a firmes e brancacentos a vermelhos (DE LAS HERAS et al., 2003). Além disso, podem infiltrar nos tecidos adjacentes como seios frontal e maxilares, gengiva e órbita. Histologicamente, são considerados adenocarcinomas de baixo grau e não são descritas metástases sistêmicas ou para linfonodos regionais (WILSON, 2017).

2.1.5 Carcinoma adenoide cístico

O carcinoma adenoide cístico é um tumor nasal raro, com provável origem das glândulas submucosas, que consiste na formação de cordões uniformes e pequenos ou de ninhos sólidos, cujas células tendem a ser circundadas por material mucoide basofílico ou hialino e os espaços císticos preenchidos por esse material dando aspecto cribiforme ao tumor. As células basaloides apresentam núcleos hipercromáticos e citoplasma basofílico indistinto. Além disso, as figuras de mitose são raras (WILSON, 2017).

2.1.6 Carcinoma neuroendócrino

O carcinoma neuroendócrino é incomum em animais domésticos, mas existem relatos em cães e equinos. Essa neoplasia apresenta a característica de formar ninhos ou cordões de células pequenas a médias separadas por delicado estroma fibrovascular. As células neoplásicas são redondas a poliédricas, apresentam citoplasma eosinofílico e granular e núcleos pequenos, redondos e centrais. Observam-se ainda, formação de rosetas e necrose e mineralização no centro de grandes massas tumorais (WILSON, 2017).

A diferenciação entre este tipo tumoral com os neuroblastomas olfatórios é particularmente difícil e, neste sentido, a marcação imunohistoquímica para citoqueratina, cromogranina A e sinaptofisina é mais regular nos carcinomas neuroendócrinos (WILSON, 2017).

2.2 NEOPLASIAS MESENQUIMAIS

A cavidade nasal e os seios paranasais podem apresentar neoplasias mesenquimais benignas como fibroma, condroma (ocorre em várias espécies) e osteoma (ocorre principalmente em bovinos e equinos), ou malignas como fibrossarcoma, osteossarcoma e condrossarcoma (SANTOS; GUEDES, 2016). Importante ressaltar que as neoplasias de origem mesenquimal da cavidade nasal e região paranasal são indistinguíveis dos observados em outros locais do organismo (LÓPEZ, 2009).

2.2.1 Condrossarcoma

O condrossarcoma é uma neoplasia maligna de células cartilaginosas com produção de matriz cartilaginosa (SERAKIDES, 2016). Sendo que os condrossarcomas da cavidade nasal de cães são pouco frequentes e apresentam baixo índice metastático. No entanto, tendem a destruir os cornetos nasais, expandir na cavidade e nos seios adjacentes, infiltrar nos ossos adjacentes e nos tecidos moles circundantes (THOMPSON; DITTMER, 2017).

Geralmente formam grandes massas compostas por múltiplos nódulos multifocais a coalescentes de tamanho variável, macios a moderadamente firmes, translúcidos, brancos ou branco acinzentados. Alguns nódulos maiores contêm áreas de necrose (THOMPSON; DITTMER, 2017).

Microscopicamente, são constituídos por células neoplásicas mesenquimais produtoras de matriz condroide semelhante a cartilagem hialina e com seus critérios de malignidade. Contudo, a diferenciação entre condrossarcomas e condromas pode ser difícil. Além disso, os osteossarcomas condroblásticos contêm muitas áreas que podem ser facilmente diagnosticadas como condrossarcoma se examinado isoladamente. Assim, o diagnóstico preciso requer amostras extensas de biópsia e cuidadosa avaliação (THOMPSON; DITTMER, 2017).

O prognóstico de animais tratados somente com quimioterapia é menos favorável do que se combinado com ressecção cirúrgica, e se torna reservado devido à natureza infiltrativa e rápido crescimento dos condrossarcomas nasais (DALECK; DENARDI; RODASKI, 2009).

2.2.2 Osteossarcoma

O osteossarcoma é originado de células mesenquimais primitivas malignas com diferenciação osteoblástica (EHRHART; CHRISTENSEN; FAN, 2020), as quais produzem oteoide ou tecido ósseo mineralizado (SERAKIDES, 2016).

A causa dessa neoplasia é desconhecida, porém, acredita-se que o osteossarcoma ocorra com maior frequência em ossos que suportam maior quantidade de peso e em locais próximos a fises de fechamento tardio. Além disso, animais de grande porte têm maior predisposição a traumas pequenos e múltiplos nas metáfises que apresentam maior atividade proliferativa e isso seria outro fator predisponente (GELLASCH et al., 2002). Neste contexto, existem descrições de osteossarcomas ocorrendo em locais de implantes metálicos, associados a fraturas e com osteomielite crônica (THOMPSON; DITTMER, 2017).

Frequentemente os osteossarcomas acontecem com maior frequência no esqueleto apendicular em comparação ao esqueleto axial e crânio (EHRHART; CHRISTENSEN; FAN, 2020). Em estudo realizado por Heyman et al. (1992), de 116 casos de osteossarcoma primário no esqueleto axial em cães, o local de maior acometimento foi mandíbula (27%), seguido por maxila (22%), vértebras (15%), crânio (14%), costelas (10%), cavidade nasal (9%) e pelve (6%).

O envolvimento dos seios paranasais e da cavidade nasal é extremamente raro (TOLEDO et al., 2018), mas quando ocorre é mais comum em cães e gatos (SANTOS; GUEDES, 2016), são localmente invasivos, causam destruição óssea e deformidade facial (EHRHART; CHRISTENSEN; FAN, 2020).

Microscopicamente, as características podem variar consideravelmente, no entanto, o principal achado é a produção de osteoide e/ou osso pelas células mesenquimais malignas. Os

osteossarcomas podem ser subclassificados histologicamente em osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, teleangiectásico, pobremente diferenciado e do tipo células gigantes (SERAKIDES, 2016).

O tempo de sobrevivência em cães com osteossarcoma intranasal geralmente é maior que em outros tipos de sarcoma intranasal, porque o osteossarcoma se desenvolve mais lentamente e é mais sensível à radioterapia (SONES et al., 2013). A resposta à quimioterapia é imprevisível, porém necessária em casos de doença metastática e para melhorar a qualidade de vida do paciente. Protocolos de quimioterapia adjuvante incluem a carboplatina e doxorrubicina, utilizados isoladamente ou combinados (EHRHART; CHRISTENSEN; FAN, 2020). Independentemente do tratamento escolhido, o diagnóstico precoce é fator prognóstico essencial e beneficia o resultado de pacientes com osteossarcoma intranasal (TOLEDO et al., 2018).

2.2.3 Fibrossarcoma

O fibrossarcoma, classificado como neoplasia mesenquimal maligna, é originado de fibroblastos (CONCEIÇÃO; LOURES, 2016) e considerado, em animais domésticos, a neoplasia mesenquimal mais comum na cavidade nasal (SANTOS; GUEDES, 2016), sendo mais comum em gatos, menos comum em cães e raros em outras espécies (HARGIS; GINN, 2009). Existe relato da ocorrência dessa neoplasia na região paranasal de equinos (HEAD; DIXON, 1999) e também ossos maxilares e seios paranasais em bovinos (BRITT et al., 1998).

Com relação a etiologia, acredita-se que o fibrossarcoma possa ter associação com o vírus da leucemia felina (FeLV) em gatos jovens (HARGIS; GINN, 2009).

Macroscopicamente, são localmente invasivos, difíceis de excisar completamente, firmes e branco acinzentados (HARGIS; GINN, 2009). Histologicamente, as células neoplásicas são fusiformes e dispostas em feixes, com quantidades variáveis de matriz extracelular colagênica. De acordo com o grau de diferenciação neoplásico, os núcleos podem variar de grandes e com baixa anisocariose até altamente pleomórficos e hipercromáticos (CONCEIÇÃO; LOURES, 2016).

2.2.4 Sarcoma pleomórfico indiferenciado (histiocitoma fibroso maligno)

A nomenclatura deste tumor é controversa. Embora possa ser referido como “sarcoma pleomórfico indiferenciado” ou “sarcoma anaplásico de células gigantes”, esse tipo de

neoplasia é mais reconhecido como histiocitoma fibroso maligno. O termo refere-se a um grupo de tumores com características histológicas semelhantes à dos histiócitos e fibroblastos, (CHRISTENSEN; LIPTAK, 2020).

Essa neoplasia é incomum, altamente agressiva, frequentemente disseminada e originada de células mesenquimais primitivas (VALLI; BIENZLE; MEUTEN, 2017). Quando presentes em cães, ocorrem em animais de meia-idade a mais velhos, das raças Golden Retriever, Labrador Retriever e Rottweiler (FULMER; MAULDIN, 2007). Em outras espécies são ainda mais raras, tendo relato de histiocitoma fibroso maligno em felinos (COURT et al., 1993) e equinos (PACIELLO et al., 2013).

O diagnóstico definitivo dessa neoplasia é feito associando os achados histopatológicos à marcação imunohistoquímica para lisozima e alfa1-antitripsina. Microscopicamente, as células são grandes e pleomórficas, com citoplasma frequentemente vacuolizado, núcleos redondos, centrais de variados tamanhos ou excêntricos e com endentação, cromatina regular e um a dois nucléolos evidentes. Há ainda células gigantes multinucleadas em grande quantidade, alto índice mitótico, áreas de necrose e inflamação (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos) (PACIELLO et al., 2013).

2.3 OUTROS TUMORES

2.3.1 Linfoma

Compreende um diverso grupo de neoplasias que têm em comum sua origem nos linfócitos. Usualmente surgem em tecidos linfoides como linfonodos, baço e medula óssea, mas podem desenvolver em outros órgãos (VAIL; THAMM; LIPTAK, 2020). Há diferentes classificações quanto à variação anatômica, mas o linfoma normalmente é classificado em: mediastinal, alimentar, multicêntrico e extranodal. Os extranodais podem ter apresentação renal, nasal, cutânea ou no sistema nervoso central (ETTINGER, 2003). O linfoma nasal é a causa mais comum de doença nasofaríngea em gatos, e pouco frequente nas outras espécies (WILSON, 2017), com relatos em cães (RODRIGUES et al., 2016) e bovinos (BRAUN et al., 2015).

O linfoma nasal ocorre com maior frequência em gatos FeLV negativos e mais velhos (entre 8 e 9 anos) (ETTINGER, 2003). Gatos positivos para o vírus da leucemia felina (FeLV) com linfoma tendem a ser jovens e apresentar a forma mediastinal (MOORE, 2013).

Histologicamente os linfócitos são intermediários a alto grau e o imunofenótipo é geralmente de células do tipo B (ETTINGER, 2003). De maneira geral os linfomas são classificados de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (VALLI et al., 2011).

Em muitos casos de linfoma extranodal periférico, o diagnóstico pode ser feito utilizando a citologia aspirativa por agulha fina no órgão acometido. O diagnóstico pode ser confirmado por meio de citologia, em até 75% dos casos, seguido por histopatologia (COUTO, 2000).

A radiação é uma forma de tratamento promissora para os linfomas localizados como o nasal, intracraniano, espinha e mediastinal refratário, visto que as células neoplásicas são sensíveis a radiação (ETTINGER, 2003). Gatos com linfoma nasal costumam ter prognóstico favorável já que geralmente a doença é localizada, animais ainda se alimentam e são FeLV negativos. O tratamento com radioterapia oferece alta chance de remissão a longo prazo às vezes com possibilidade de cura (MOORE, 2013).

2.3.2 Mastocitoma

Os mastócitos são células derivadas de células CD34, produzidas da medula óssea, que se diferenciam quando migram para tecido conjuntivo ou mucosa. A proliferação descontrolada dessas células caracteriza esta neoplasia maligna (KIUPEL, 2017). O mastocitoma cutâneo canino é comum e representa de 7 a 21% dos tumores de pele nos cães. Na cavidade nasal é pouco relatada tanto no cão como nas outras espécies (NAGANOBU et al., 2000).

Pode ter origem cutânea ou visceral, sendo que a visceral geralmente é metástase advinda de um tumor cutâneo primário. É comumente encontrada nas regiões do tronco, cabeça e pescoço, mas pode afetar os membros, períneo, escroto, glândula salivar, trato gastrointestinal, cavidade oral e nasal (PALMA et al., 2009).

Macroscopicamente, são tumores pequenos, circunscritos e firmes, no entanto em alguns casos, podem ser macios e grandes (PALMA et al., 2009), além disso, ulceração e necrose são achados frequentes (CONCEIÇÃO; LOURES, 2016).

Microscopicamente, são constituídos por células redondas contendo grânulos citoplasmáticos basofílicos que são evidenciados por colorações especiais (Giemsa ou azul de toluidina). Adicionalmente, pode-se observar infiltrado inflamatório eosinofílico e colagenólise (CONCEIÇÃO; LOURES, 2016).

O diagnóstico pode ser realizado inicialmente por citologia, com posterior confirmação pelo exame histopatológico. O grau da neoplasia pode ser definido pela avaliação histológica e

isso consequentemente determina o prognóstico e tratamento. Com a finalidade de evitar discordâncias entre patologistas e ampliar o acerto prognóstico mediante a avaliação histológica, Kiupel et al. (2011) elaboraram um novo sistema de classificação em dois grupos histológicos para os mastocitomas: o alto grau e baixo grau. No sistema de grau histológico de Kiupel, os mastocitomas são considerados de alto grau se apresentarem baixa granulação ou duas das quatro características seguintes: pleomorfismo nuclear, presença de figuras de mitose, binucleação ou multinucleação ou marcada anisocariose.

Além desses métodos de diagnósticos, também são usados marcadores imuno-histoquímicos como c-KIT (CD117), que identifica a atividade metabólica. O c-KIT é um gene que codifica o KIT do receptor de tirosina quinase, responsáveis pelo desenvolvimento metabólico de alguns mastocitomas cutâneos. Os tumores de alto grau, tem uma relação importante e significativa com essas mutações (THOMPSON et al., 2011).

A abordagem terapêutica no mastocitoma depende das características clínicas, estadiamento clínico, grau histológico e presença ou ausência de fatores prognósticos negativos (LONDON; THAMM, 2020). As opções de tratamento com maior taxa de sucesso são retirada cirúrgica com ampla margem de segurança e radioterapia. Desafios terapêuticos, no entanto, surgem com mastocitomas de alto grau, grandes ou infiltrativos, com metástases ou não excisáveis (BURTON et al., 2015).

2.3.3 Tumor venéreo transmissível (TVT)

O tumor venéreo transmissível (TVT) tem distribuição cosmopolita (NASCIMENTO; SANTOS; EDWARDS, 2016), afeta cães e outras espécies de canídeos, como lobo e coiote (FOSTER, 2009) e, como o próprio nome indica, sua transmissão ocorre de forma venérea (NASCIMENTO; SANTOS; EDWARDS, 2016). Acredita-se que tenham origem em uma alteração genética específica nos histiócitos caninos (FOSTER, 2009). O tumor é transmitido por inoculação de células neoplásicas intactas em lesões de mucosa ou cutâneas durante o acasalamento, mas às vezes, comportamentos sociais como morder, cheirar e lamber também podem transmiti-lo (GUREL et al., 2002).

A doença é geralmente considerada benigna e localizada nas regiões genitais (NASCIMENTO; SANTOS; EDWARDS, 2016) mas há relatos de metástases em outros órgãos do corpo, como pele, cavidade oral e nasal, conjuntiva, reto e fígado (GUREL et al., 2002). Chikweto et al. (2013) relataram 19,2% de cães com TVT em locais extragenitais como

cavidade nasal, órbita ocular, baço, fígado, pele, costelas, linfonodos subcutâneos, submandibulares, cervicais e inguinais.

Macroscopicamente o TVT nasal é identificado como uma deformidade do focinho, geralmente com presença de massa friável, secreção nasal purulenta e linfadenopatia submandibular. A citologia é altamente diagnóstica e observa-se grande número de células redondas com nucléolo proeminente e citoplasma basofílico e vacuolizado (PAPAZOGLOU et al., 2001). À histologia, observa-se proliferação de células redondas grandes e uniformes, núcleo e nucléolo grandes, numerosas figuras de mitose e discreto estroma (FOSTER, 2009).

A quimioterapia é um método eficaz de tratamento e consiste na utilização de sulfato de vincristina e, frequentemente a remissão completa ocorre em 2 a 8 semanas de aplicações intravenosas semanais. Esse medicamento é bem tolerado e possui baixo custo (DAS; DAS, 2000).

2.3.4 Neuroblastoma olfatório

O neuroblastoma olfatório, também conhecido como estesioneuroblastoma, é um tumor maligno (BROSINSKI et al., 2012) que se origina de células neuroectodérmicas primitivas e raramente relatado em animais domésticos (WILSON, 2017). Existem relatos em cães (KITAGAWA et al., 2006), gatos (COX; POWERS, 1989), cavalos (YAMATE et al., 2006) e bovinos (ANDERSON; CORDY, 1981). Na espécie felina, sugere-se que o mesmo seja induzido pelo vírus da leucemia felina (FeLV) (MOORE; OGILVIE, 2001).

Microsccopicamente são compostos por pequenas células com núcleos hipercromáticos, pouco citoplasma e tendem a localizar-se ao redor dos vasos sanguíneos, formando pseudorrosetas (ECCO; LANGOHR, 2016).

Sua semelhança histológica com tumores neuroendócrinos e a baixa especificidade de marcadores imunohistoquímicos em animais domésticos usados para diagnosticar tumores em humanos, torna o diagnóstico definitivo dependente das técnicas de microscopia eletrônica onde são observados processos celulares contendo neurofilamentos microtubulares (WILSON, 2017).

2.3.5 Tumor da bainha de nervos periféricos

O tumor da bainha de nervos periféricos tem origem nas células de Schwann (schwanoma benigno ou maligno) ou podem originar-se de fibroblastos do endoneuro/epineuro (neurofibroma ou neurofibrossarcoma) (SIMPSON et al., 1999).

Geralmente são reportados em caninos e bovinos, menos frequentemente em felinos e equinos e mais raramente nas outras espécies. São muito raros na cavidade nasal, tendo sua primeira descrição em um cão de seis anos no relato de Sfacteria et al. (2015).

Em medicina veterinária, muitos autores consideraram schwannoma e neurofibroma como uma entidade única, sugerindo que sejam nomeados juntamente com o termo geral de tumor da bainha de nervo periférico (TBNP) benigno e maligno devido à população celular mista e/ou falta de diferenciação celular histológica. Os TBNP, em seres humanos, normalmente são benignos (SFACTERIA et al., 2015). A diferenciação entre neoplasias malignas e benignas é essencial pois o prognóstico é bem distinto, sendo desfavorável quando o tumor é maligno (PATNAIK et al., 2002).

O TBNP maligno tem comportamento infiltrativo com destruição de tecidos adjacente, no entanto, metástases são raras (SFACTERIA et al., 2015). Além disso, são firmes a gelatinosos e branco-acinzentados (HARGIS; GINN, 2009).

Histologicamente são semelhantes aos tumores de bainha de nervo periférico descritos em outras localizações. São constituídos por grupamentos compactos uniformes de células ovais ou fusiformes alongadas, limites citoplasmáticos bem definidos e dispostas em uma matriz variável e densa de colágeno (ECCO et al., 2016), além de células arranjadas em paliçadas (HARGIS; GINN, 2009). Tumores malignos apresentam achados microscópicos de anaplasia, mitoses abundantes e necrose (SFACTERIA et al., 2015).

2.4 LESÕES SEMELHANTES A TUMORES

2.4.1 Hematoma etmoidal progressivo

O hematoma etmoidal progressivo é a lesão proliferativa mais comum em equinos (WILSON, 2017), sendo considerada uma alteração não neoplásica da cavidade nasal que se desenvolve a partir do etmoide ou da parede dos seios maxilares. Essa lesão é destrutiva localmente (SANTOS; GUEDES, 2016), provoca obstrução das passagens nasais (WILSON,

2017) e, de acordo com que o hematoma se desenvolve, há ulceração de sua superfície, ocasionando epistaxe recorrente (SANTOS; GUEDES, 2016).

Macroscopicamente, apresentam-se normalmente de forma unilateral, mas, em alguns casos, podem ser bilaterais. Além disso, têm superfície lisa e ao corte são hemorrágicos ou com áreas pálidas, marrons e hemorrágicas (WILSON, 2017).

Histologicamente, são altamente vasculares, apresentam hemorragia, tecido conjuntivo fibroso, deposição extensa de hemossiderina, acúmulo de lipofuscina e células gigantes e macrófagos com hemossiderina (WILSON, 2017).

2.4.2 Pólipos nasais e nasofaríngeos

Pólipos são lesões não neoplásicas, normalmente pedunculadas originadas da superfície mucosa da cavidade nasal ou nasofaringe, que apresentam baixa frequência de acometimento e são mais observados em gatos e equinos. A etiologia é desconhecida, porém existe associação com hiperplasia da mucosa e algum grau de inflamação crônica dos tecidos conjuntivos adjacentes, mas a relação causal entre esses fatores é incerta (WILSON, 2017).

Macroscopicamente, os pólipos são úmidos, brilhantes, ovoides ou alongados, frequentemente pedunculados, firmes, superfície lisa ou rugosa e que pode ser ulcerada, brancacentos, róseos ou vermelhos e, às vezes, podem ser múltiplos (polipose). Além disso, podem atingir um tamanho suficiente para causar dificuldade respiratória e a remoção de um pólipo pode ter recidiva, especialmente se a excisão for incompleta (WILSON, 2017).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da ampla descrição realizada, existe uma ampla variedade de neoplasias e lesões semelhantes a tumores que podem afetar a cavidade nasal e os seios paranasais das espécies domésticas. No entanto, apesar da baixa frequência de acometimento na maioria dos tipos, o diagnóstico pode ser desafiador e necessitar de exames complementares como a imunohistoquímica, dependendo do grau de diferenciação tumoral. De maneira geral, as neoplasias mais comumente diagnosticadas são as epiteliais malignas, porém, a etiologia da maioria das neoplasias é pouco elucidada.

4 REFERÊNCIAS

ANDERSON, B. C.; CORDY, D. R. Olfactory neuroblastoma in a heifer. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 18, n. 4, p. 536-540, 1981.

BRAUN, U. et al. T-cell lymphoma in the nasal cavity of a Brown Swiss heifer. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 57, n. 1, p. 8, 2015.

BRITT, L. G. et al. Facial fibrosarcoma in two cows. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Raleigh, v. 39, n. 1, p. 18-21, 1998.

BROSINSKI, K. et al. Olfactory neuroblastoma in dogs and cats–a histological and immunohistochemical analysis. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 146, n. 2-3, p. 152-159, 2012.

BURTON, J. H. et al. Pulse-administered toceranib phosphate plus lomustine for treatment of unresectable mast cell tumors in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 29, n. 4, p. 1098-1104, 2015.

CASWELL, J. L.; WILLIAMS, K. J. Respiratory system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 6. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016. p. 465-591.

CHIKWETO, A. et al. Genital and extragenital canine transmissible venereal tumor in dogs in Grenada, West Indies. **Open Journal of Veterinary Medicine**, Irvine, v. 3, p. 111-114, 2013.

CHRISTENSEN, N. I.; LIPTAK, J. M. Soft tissue sarcomas. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 6. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2020. p. 404-431.

CONCEIÇÃO, L. G.; LOURES, F. H. Sistema tegumentar. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 407-486.

COURT, E. A. et al. Malignant histiocytosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 203, n. 9, p. 1300-1302, 1993.

COUTO, C. G. Advances in the treatment of the cat with lymphoma in practice. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 2, n. 2, p. 95-100, 2000.

COX, N. R.; POWERS, R. D. Olfactory neuroblastomas in two cats. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 26, n. 4, p. 341-343, 1989.

DALECK, C. R.; DENARDI, A. B. de; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2009.

DAS, U.; DAS, A. K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 24, n. 8, p. 545-556, 2000.

DE LAS HERAS, M. et al. Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep and goats. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 275, p. 201-223, 2003.

ECCO, R.; LANGOHR, I. M. Sistema endócrino. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 703-750.

ECCO, R. et al. Sistema nervoso. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 487-572.

EHRHART, N. P.; CHRISTENSEN, N. I.; FAN, T. M. Tumors of the skeletal system. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 6. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2020. p. 524-564.

ETTINGER, S. N. Principles of treatment for feline lymphoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 98-102, 2003.

FORMIGHIERI, A. P. et al. Adenocarcinoma nasal em cão: relato de caso. **Pubvet**, Maringá, v. 6, n. 5, p. 1289-1294, 2012.

FOSTER, R. A. Sistema reprodutivo do macho. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 1317-1348.

FULMER, A. K.; MAULDIN, G. E. Canine histiocytic neoplasia: an overview. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 48, n. 10, p. 1041-1043, 2007.

GELLASCH, K. L. et al. Fatigue microdamage in the radial predilection site for osteosarcoma in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 63, n. 6, p. 896-899, 2002.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2002. p. 44-117.

GUREL, A. et al. Transmissible venereal tumors detected in the extragenital organs of dogs. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Rishon le-Zion, v. 57, n. 2, p. 23-27, 2002.

HARGIS, A. M.; GINN, P. E. O tegumento. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 1107-1262.

HEAD, K. W.; DIXON, P. M. Equine nasal and paranasal sinus tumours. Part 1: review of the literature and tumour classification. **The Veterinary Journal**, London, v. 157, n. 3, p. 261-278, 1999.

HENDRIX, D. V.; GELATT, K. N. Diagnosis, treatment and outcome of orbital neoplasia in dogs: a retrospective study of 44 cases. **The Journal of Small Animal Practice**, England, v. 41, n. 3, p. 105-108, 2000.

HEYMAN, S. J. et al. Canine axial skeletal osteosarcoma a retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 21, n. 4, p. 304-310, 1992.

KITAGAWA, M. et al. Diagnosis of olfactory neuroblastoma in a dog by magnetic resonance imaging. **Veterinary Record**, London, v. 159, n. 9, p. 288-289, 2006.

KIUPEL, M. Mast cell tumors. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 5. ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2017. p. 176-202.

KIUPEL, M. et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 48, n. 1, p. 147-155, 2011.

KUEHN, N. F. Nasal computed tomography. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 2, p. 55-59, 2006.

LONDON, C. A.; THAMM, D. H. Mast cell tumors. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 6. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2020. p. 382-403.

LÓPEZ, A. Sistema respiratório. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 463-558.

MARIANI, O. M. et al. Carcinoma espinocelular intranasal em cão: relato de caso. **Investigação**, São Paulo, v. 16, n. 5, 2017.

MOORE, A. Extranodal lymphoma in the cat: prognostic factors and treatment options. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 15, n. 5, p. 379-390, 2013.

MOORE, A. S.; OGILVIE, G. K. **Feline oncology:** a comprehensive guide to compassionate care. Trenton: Veterinary Learning Systems, 2001.

NAGANOBU, K. et al. Mast cell tumor in the nasal cavity of a dog. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 62, n. 9, p. 1009-1011, 2000.

NASCIMENTO, E. F. do.; SANTOS, R. L.; EDWARDS, J. F. Sistema reprodutivo masculino. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 805-828.

PACIELLO, O. et al. Histiocytic sarcoma of the nasal cavity in a horse. **Research in Veterinary Science**, London, v. 94, n. 3, p. 648-650, 2013.

PAIVA, S. C. C. S. et al. Transicional carcinoma with extensive invasion of the bony orbit in a dog. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 4, p. 1017-1023, 2013.

PALMA, H. E. et al. Mastocitoma cutâneo canino: revisão. **MEDVEP - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, São Paulo, v. 7, p. 523-528, 2009.

PAPAZOGLOU, L. G. et al. Primary intranasal transmissible venereal tumour in the dog: a retrospective study of six spontaneous cases. **Journal of Veterinary Medicine A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, Berlin, v. 48, n. 7, p. 391-400, 2001.

PATNAIK, A. K. et al. Malignant nerve-sheath tumor with divergent and glandular differentiation in a dog: a case report. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 39, n. 3, p. 406-410, 2002.

POWNDER, S.; ROSE, M.; CRAWFORD, J. Radiographic techniques of the nasal cavity and sinuses. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 2, p. 46-54, 2006.

RODRIGUES, R. T. G. A. et al. Linfoma intranasal em cão: aspectos clínicopatológicos e imunoistoquímicos. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 10, n. 1, p. 84-91, 2016.

SANTOS, R. L.; GUEDES, R. M. C. Sistema respiratório. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 1-47.

SERAKIDES, R. Ossos e articulações. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 619-662.

SFACTERIA, A. et al. Peripheral nerve sheath tumor invading the nasal cavities of a 6-year-old female Pointer dog. **Veterinary Quarterly**, Dordrecht, v. 35, n. 3, p. 170-173, 2015.

SIMPSON, D. J. et al. Diagnosis and excision of a brachial plexus nerve sheath tumour in a dog. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 77, n. 4, p. 222-224, 1999.

SONES, E. et al. Survival times for canine intranasal sarcomas treated with radiation therapy: 86 cases (1996–2011). **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Raleigh, v. 54, n. 2, p. 194-201, 2013.

STÜNZI, H.; HAUSER, B. Tumors of the nasal cavity. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 53, n. 2-3, p. 257-263, 1976.

SVARA, T. et al. Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep in Slovenia. **Journal of Veterinary Medicine A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, Berlin, v. 53, n. 1, p. 26-29, 2006.

THOMPSON, J. J. et al. Canine subcutaneous mast cell tumors: cellular proliferation and KIT expression as prognostic indices. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 48, n. 1, p. 169-181, 2011.

THOMPSON, K. G.; DITTMER, K. E. Tumors of bone. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 5. ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2017. p. 356-424.

TOLEDO, G. N. de. et al. Intranasal osteosarcoma in a dog - a case report. **Topics in Companion Animal Medicine**, New York, v. 33, n. 2, p. 35-39, 2018.

VAIL, D. M.; THAMM, D. H.; LIPTAK, J. M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 6. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2020. p. 688-772.

VALLI, V. E.; BIENZLE, D.; MEUTEN, D. J. Tumors of the hemolymphatic system. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals.** 5. ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2017. p. 203-321.

VALLI, V. E. et al. Classification of canine malignant lymphomas according to the world health organization criteria. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 48, n. 1, p. 198-211, 2011.

WILSON, D.W.; DUNGWORD, D. L. Tumors of the respiratory tract. In: MEUTEN, D. J. **Tumors of domestic animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2002. p.365-399.

WILSON, D. W. Tumors of the respiratory tract. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 5. ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2017. p. 467-477.

YAMATE, J. et al. Olfactory neuroblastoma in a horse. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 68, n. 5, p. 495-498, 2006.

Leucemia viral felina: aspectos gerais e terapia antiviral

Driéle Lutzke[1]
Franciely Mota de Oliveira[2]
Larissa Marchiori Sena[3]
Leonardo Oliveira Trivilin[4]
Karina Preising Aptekmann[5]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: drielelutzke@gmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: franciely.mvet@gmail.com
[3] Faculdade Pitágoras, e-mail: lmsmvet@gmail.com
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: leotrivilin@gmail.com
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kapreising@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um retrovírus que infecta gatos domésticos e se encontra disseminado por todo o mundo. Sua prevalência é dependente da região geográfica, bem como dos hábitos dos tutores em testar seus gatos, vacinar e evitar a exposição destes a fatores de risco (KENNEDY; LITTLE, 2012; WESTMAN et al., 2016).

Sua alta patogenicidade e tropismo por vários tecidos, permite ao FeLV produzir sinais clínicos inespecíficos no gato portador, porém, a indução de alterações imunossupressoras, proliferativas e degenerativas são suas principais características, o que pode conferir menor tempo de vida ao animal, principalmente aqueles infectados quando filhotes (KENNEDY; LITTLE, 2012).

Devido à variedade de sinais clínicos apresentados pelos animais infectados e a dificuldade na escolha do exame diagnóstico mais adequado para cada gato, faz-se necessário o estudo do comportamento viral em seu hospedeiro e das síndromes que o FeLV pode induzir nos gatos infectados, para que a identificação dos animais positivos não seja prejudicada. E, ainda que não haja tratamento antiviral eficaz na eliminação do FeLV em gatos com a infecção progressiva, o conhecimento de medidas preventivas é importante para que o número de animais infectados diminua em países como o Brasil. Desta forma, objetiva-se apresentar uma revisão de literatura sobre a leucemia viral felina, com o intuito de contribuir para o entendimento da doença e ressaltar a médicos veterinários sua importância na medicina felina.

2 LEUCEMIA VIRAL FELINA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO E SUBGRUPOS

O vírus da leucemia felina (*Feline Leukemia Virus* - FeLV) é um retrovírus do gênero Gammaretrovirus e subfamília Oncornavirinae, envelopado e com material genético arranjado em fita de RNA simples, sendo dependente de um DNA intermediário para replicação (HARTMANN, 2012). Em 1964, foi descrito por Jarrett et al. (1964), após o isolamento de partículas virais em linfoma que se desenvolveu em linfonodo mesentérico de um gato doméstico.

Possivelmente, os genes relacionados ao FeLV foram transmitidos ao gato pelo rato, devido sua similaridade gênica com vírus endógenos encontrados em roedores ancestrais (BENVENISTE; SHERR; TODARO, 1975).

Os retrovírus endógenos (ERVs - *endogenous retroviruses*) são vírus que podem usualmente ser transmitidos como provírus no DNA entre os vertebrados, por meio da infecção das células germinativas dos progenitores à progênie (QUINN et al., 2005). Geralmente, estes retrovírus mantêm-se estáveis no hospedeiro, com poucas mudanças entre as gerações (BOEKE; STOYE, 1997) e são silenciados por regulação celular (QUINN et al., 2005).

No gato, foram identificados retrovírus endógenos, sendo um deles o enFeLV (vírus da leucemia felina endógeno), que não apresenta caráter infeccioso para o portador (BOEKE; STOYE, 1997), mas pode contribuir com genes *env* (envelope) para a mutação do FeLV (QUINN et al., 2005), permitindo mudanças genômicas (BOEKE; STOYE, 1997), que serão importantes na determinação de qual apresentação clínica da infecção o hospedeiro poderá desenvolver (KENNEDY; LITTLE, 2012).

Com base no mapa genético do FeLV, são conhecidos alguns subgrupos, sendo o subgrupo A, o único transmitido horizontalmente (JARRETT; RUSSELL, 1978), e considerado o menos patogênico (JARRETT et al., 1978). A partir da mutação do FeLV-A e/ou sua combinação com vírus endógenos, há o desenvolvimento dos demais subgrupos até então identificados: FeLV-B, FeLV-C, FeLV-D, FeLV-T e FeLV-TG35 (CHIU; HOOVER; VANDEWOUDE, 2018).

O subgrupo B surgiu da combinação do FeLV-A com enFeLV (STEWART et al., 1986), enquanto o FeLV-C se desenvolveu devido a mutações no *env* do FeLV-A (RIGBY et al., 1992). O tipo T também surgiu de mutações no *env* do FeLV-A, principalmente aquelas na região gp70 (DONAHUE et al., 1991).

O FeLV-D foi descrito em 2012, sendo caracterizado como um subgrupo viral recombinante, oriundo da transdução do gene *env* de um novo retrovírus endógeno, com possível caráter infeccioso no gato doméstico, denominado ERV-DC que se comporta como doador ou receptor de genes para retrovírus exógenos (ANAI et al., 2012).

Em 2016 foi sugerido o mais recente subgrupo, o FeLV-TG35 ou FeLV-E, que seria resultado de mutações na proteína TG35-2 do envelope retroviral do FeLV, oriundas da pressão de seleção em gatos (MIYAKE et al., 2016).

2.2 PREVALÊNCIA

Gatos domésticos e selvagens são passíveis de se infectar pelo FeLV (FROMONT et al., 2000), o qual apresenta distribuição mundial, e cuja prevalência é dependente da região geográfica, da população estudada, bem como dos hábitos dos tutores em testar seus gatos,

vacinar e evitar a exposição destes a fatores de risco (KENNEDY; LITTLE, 2012; WESTMAN et al., 2016).

A prevalência do FeLV em uma população mista de gatos (domiciliados, semi-domiciliados e de vida livre) numa região da Itália foi de 8,4% (BANDECCHI et al., 2006). Ao passo que numa população de 1876 gatos de vida livre dos Estados Unidos, a prevalência de gatos progressivos foi de 4,3% (LEE et al., 2002), no noroeste da China de 11,33% (CONG et al., 2015) e no Reino Unido, a infecção pelo FeLV em gatos que deram entrada em dois abrigos foi de 3% (14/474) e 0% (0/135) (STAVISKY; DEAN; MOLLOY, 2017).

Um estudo conduzido com gatos da região sul, sudeste e leste da Austrália identificou apenas 0,5% dos gatos assintomáticos com infecção progressiva pelo FeLV e estes pertenciam a clientes de clínicas veterinárias; enquanto aqueles oriundos de duas instalações de resgate tiveram 18% e 24% dos gatos infectados. Valores similares foram encontrados quanto ao número de infecções regressivas, onde apenas 2% dos gatos assintomáticos de clientes apresentavam este tipo de infecção, e nas instalações de resgate foi de 18% e 29% (WESTMAN et al., 2019). Em uma região da Rússia, 15,9% dos gatos apresentavam o DNA proviral do FeLV (TATYANA et al., 2019).

Gatos doentes e saudáveis de uma região do sul do Brasil foram estudados quanto ao seu *status* virêmico e a prevalência foi de 28,41% e 9,89%, respectivamente (BIEZUS et al., 2019). Na Malásia, 12% dos gatos atendidos em um hospital veterinário privado foram positivos em testes ELISA (SIVAGURUNATHAN; ATWA; LOBETTI, 2018).

2.3 TRANSMISSÃO

Apenas o subgrupo A é efetivamente transmitido por via horizontal (JARRETT; RUSSELL, 1978), e essa característica é reconhecida desde a década de 70, sendo possivelmente o fator epidemiológico mais importante no ciclo de transmissão do FeLV (JARRETT et al., 1973), visto que a forma mais comum de contágio é o contato próximo e prolongado de um gato infectado com um suscetível. Portanto, é por meio da saliva que os gatos virêmicos eliminam constantemente o vírus no ambiente, independente da presença de sinais clínicos. Porém, por se tratar de um vírus envelopado, e que não resiste muito tempo fora do hospedeiro, alguns comportamentos inerentes a espécie como limpeza mútua, brigas e mordidas facilitam a transmissão, assim como, o compartilhamento de pratos de comida e água (HARTMANN, 2012).

Além da saliva, gatos infectados progressivamente também podem eliminar o agente por meio de fluidos corpóreos como, secreção nasal, leite, urina e fezes (LITTLE et al., 2020). Nas fezes e urina de gatos com infecção progressiva, o vírus pode ser isolado entre 3-6 semanas após a infecção, mas não em gatos com infecção regressiva (CATTORI et al., 2009). E apesar do FeLV ser eliminado nas fezes e urina de gatos, e ter sido detectado em fezes de pulgas, estas não parecem ser formas eficientes ou claramente relevantes para a transmissão do vírus entre gatos (HARTMANN, 2012).

Fêmeas gestantes infectadas podem transmitir o FeLV para os seus filhotes por via transplacentária ou por meio da amamentação, bem como durante as atividades de *grooming* de seus filhotes (HARTMANN, 2012).

A transmissão iatrogênica por meio da transfusão de sangue oriunda de gatos portadores do provírus do FeLV a gatos negativos, também foi comprovada (NESINA et al., 2015).

Muitas exposições ao FeLV podem resultar em infecções transitórias, que podem ser reconhecidas mais tarde apenas pela presença de anticorpos. No entanto, quanto maior a dose e a exposição ao vírus, maior a probabilidade de transmissão (JARRETT et al., 1973), sendo que gatos filhotes, apresentam maior chance de se tornarem persistentemente infectados. Gatos adultos também podem se infectar naturalmente e transmitir a doença, porém, foi reconhecido o aumento na resistência a infecção com o avançar da idade (LITTLE et al., 2020).

A localização geográfica e o estado de saúde dos gatos foram identificados como fatores de risco para a infecção pelo FeLV (WESTMAN et al., 2016), e o sexo do gato tem sido identificado como um fator predisponente para a infecção em alguns estudos (BIEZUS et al., 2019), e em outros não (LEE et al., 2002).

2.4 PATOGÊNESE

Após a exposição inicial, o FeLV se replica nos tecidos linfoides próximos ao local de inoculação, realizando uma viremia primária, onde há a infecção de monócitos e linfócitos periféricos, que disseminam o vírus para tecidos linfoides sistêmicos. Nesta primeira viremia, o FeLV pode infectar células nucleadas da medula óssea, em 7 a 21 dias após a exposição inicial. A partir deste momento, pode ocorrer uma viremia secundária, onde a infecção é amplificada pela liberação de leucócitos e plaquetas no sangue periférico contendo o FeLV. A viremia persistente se estabelece em 14 a 28 dias, quando então, o vírus produzirá infecção epitelial generalizada, e começará a ser continuamente excretado para o ambiente (LITTLE et al., 2020; ROJKO et al., 1979).

Para que os retrovírus estabeleçam infecção, é necessária sua entrada nas células alvo, por meio de interações de glicoproteínas do envelope viral com proteínas celulares. Após a fusão das membranas virais e celulares, o RNA viral será transcrito reversamente em DNA, para posteriormente ter sua informação genética integrada ao genoma da célula hospedeira como provírus (HARTMANN, 2012; NISOLE; SAÏB, 2004).

Gatos que se tornaram persistentemente virêmicos não conseguiram conter a infecção em seu estágio inicial devido resposta imune específica insuficiente. Com isso, o FeLV pode completar seu ciclo no hospedeiro, infectando os tecidos aos quais apresenta tropismo, e sendo eliminado nas secreções do portador, configurando a infecção progressiva (LITTLE et al., 2020). Esta forma da infecção é mais comum em gatos jovens (WESTMAN et al., 2017).

Uma parcela dos gatos que forem infectados pelo FeLV pode exibir resposta imune parcialmente eficiente, que impede o estabelecimento da viremia secundária, mas não elimina completamente a infecção, que só será detectada por meio de ensaios que detectem o DNA proviral do FeLV, sendo este tipo de infecção denominada como regressiva (LITTLE et al., 2020), a qual aparentemente ocorre mais frequentemente em gatos mais velhos (WESTMAN et al., 2017).

Muitos gatos podem estabelecer contato com o FeLV, produzir anticorpos neutralizantes, mas não permitir o estabelecimento de infecção em nenhum grau. Este tipo de situação é caracterizado como infecção abortiva (LITTLE et al., 2020).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A leucemia viral felina pode produzir variados sinais clínicos, e alguns deles são comuns a outras doenças como letargia, hiporexia e perda de peso (MCCAW et al., 2001). Muitos gatos podem permanecer assintomáticos por longos períodos (KENNEDY; LITTLE, 2012), no entanto, uma parcela poderá ir a óbito em decorrência da infecção (MCCAW et al., 2001), principalmente pelas síndromes imunossupressivas, proliferativas ou degenerativas que o vírus pode induzir (KENNEDY; LITTLE, 2012).

As anormalidades induzidas pela infecção do FeLV estão principalmente relacionadas aos subgrupos virais que o hospedeiro apresenta, e fatores como idade de aquisição da infecção, resposta imune individual e carga viral (LUTZ et al., 2009).

Gatos portadores do FeLV apresentam algum grau de debilidade imunológica mesmo que não apresentem sinais evidentes disto (LUTZ et al., 2009), e vários mecanismos complexos podem contribuir para o quadro (KENNEDY; LITTLE, 2012). Sendo assim, pacientes

virêmicos comumente são portadores de outras doenças infecciosas (CONG et al., 2015; GIL et al., 2013), podem desenvolver úlceras orais, gengivoestomatite, alterações oftálmicas (GIL et al., 2013) e sinais respiratórios (MCCAW et al., 2001). Alguns gatos podem apresentar esses sinais de forma crônica ou intermitente, e o tempo de recuperação e/ou tratamento de comorbidades podem ser mais prolongados nesses pacientes (LUTZ et al., 2009).

Uma síndrome de imunodeficiência grave (DONAHUE et al., 1991) pode ocorrer em gatos portadores do subgrupo T, pois este subgrupo apresenta tropismo por linfócitos T (ANDERSON et al., 2000), causando sua destruição, o que pode ser fatal ao gato portador (DONAHUE et al., 1991)

O potencial oncogênico do FeLV foi sugerido em 1964, após seu isolamento em um gato com linfoma (JARRETT et al., 1964). O vírus ao integrar seu material genético ao da célula do hospedeiro, pode induzir alterações no ciclo celular, o que pode resultar em transformações malignas (CALAZANS; DALECK; DE NARDI, 2016). Acredita-se que, quanto maior a quantidade e o tempo de exposição ao vírus, maior a probabilidade do desenvolvimento de neoplasias (JARRETT et al., 1973).

Os linfomas são as neoplasias mais associadas a infecção pelo FeLV (FIGURAS 1 e 2), principalmente em regiões onde a prevalência do vírus ainda é alta (CRISTO et al., 2019), e a infecção pelo subgrupo B tem sido associado ao desenvolvimento desse tipo neoplásico (KENNEDY; LITTLE, 2012). Além de linfomas, leucemias (FIGURA 3) e neoplasias não-hematopoiéticas podem ser induzidas pela infecção do FeLV (LUTZ et al., 2009).

Gatos infectados pelo FeLV também podem desenvolver quadros anêmicos, os quais são secundários a infecção por *Mycoplasma haemofelis*, ou a anemias não regenerativas (KENNEDY; LITTLE, 2012), as quais geralmente estão associadas a infecção pelo subgrupo C. Este subgrupo apresenta afinidade por células precursoras eritroides, suprimindo-as e causando sua degeneração, com isso pode haver o desenvolvimento de hipoplasia eritroide ou anemia aplásica, principalmente em gatos mais jovens (JARRETT et al., 1978; RIGBY et al., 1992). O subgrupo C também foi isolado em um gato com leucemia linfocítica (RICKARD et al., 1967).

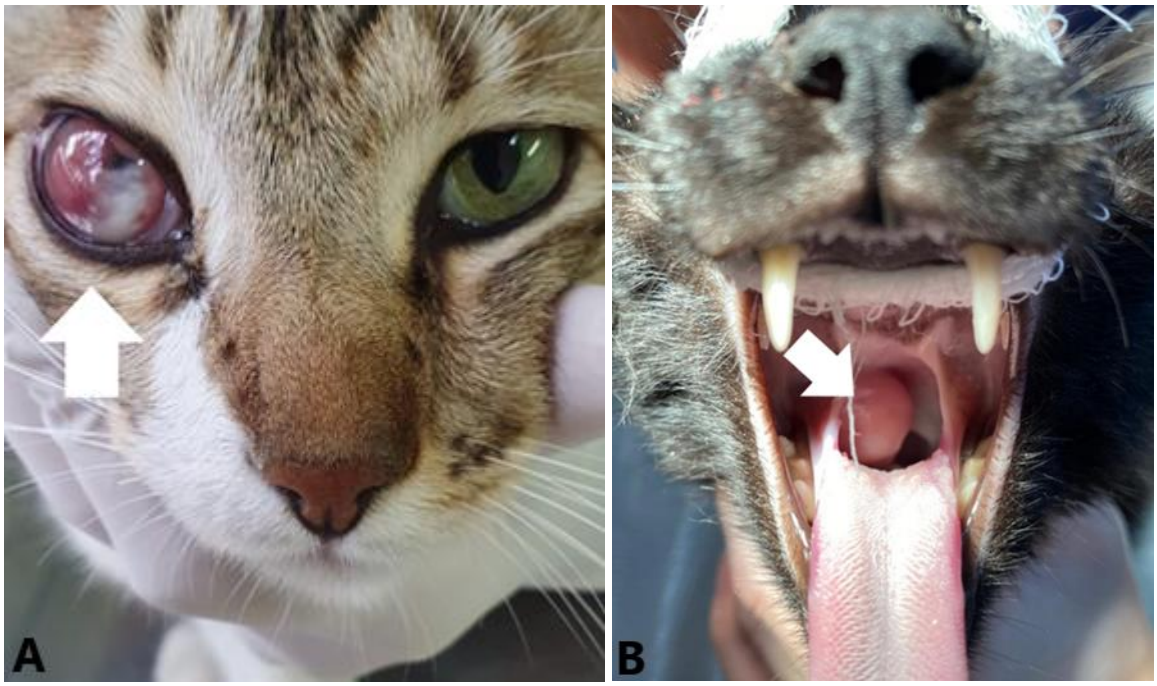

Figura 1 – Aspectos clínicos do linfoma em gatos domésticos portadores de FeLV. A) Paciente felino, aproximadamente 4 anos, portador do FeLV, apresentando massa em câmara anterior ocular direita (seta). O animal ainda apresentava massa nos dois rins e nos dois testículos. Diagnóstico presuntivo: Linfoma. B) Paciente felino, aproximadamente 1 ano, portador do FeLV, apresentando massa em região de orofaringe (seta). O animal também apresentava massa em mediastino cranial. Diagnóstico presuntivo: Linfoma.
Fonte: Arquivos do Serviço de Clínica Médica e Cirúrgica do HOVET/UFES (2020).

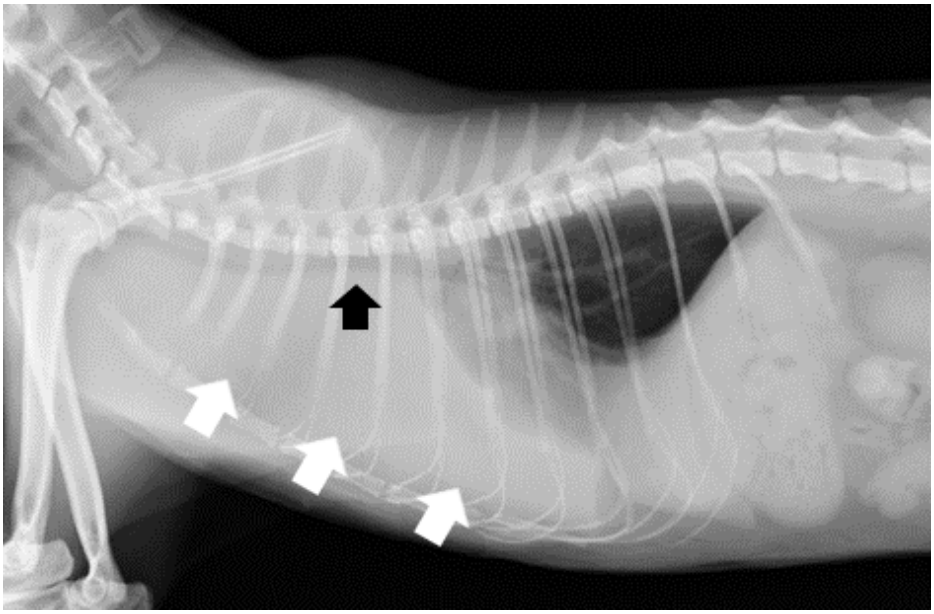

Figura 2 – Imagem radiográfica na posição látero-lateral de paciente felino, aproximadamente 2 anos, portador do FeLV, com dispneia leve, abafamento das bulhas cardíacas e áreas de silêncio pulmonar. Impressão radiográfica: Permanência de radiopacidade em região de mediastino cranial (setas brancas) após toracocentese, deslocamento dorsal da traqueia (seta preta) e não delimitação da silhueta cardíaca. Diagnóstico presuntivo: Linfoma mediastinal.
Fonte: Arquivos do Serviço de Diagnóstico por Imagem do HOVET/UFES (2020).

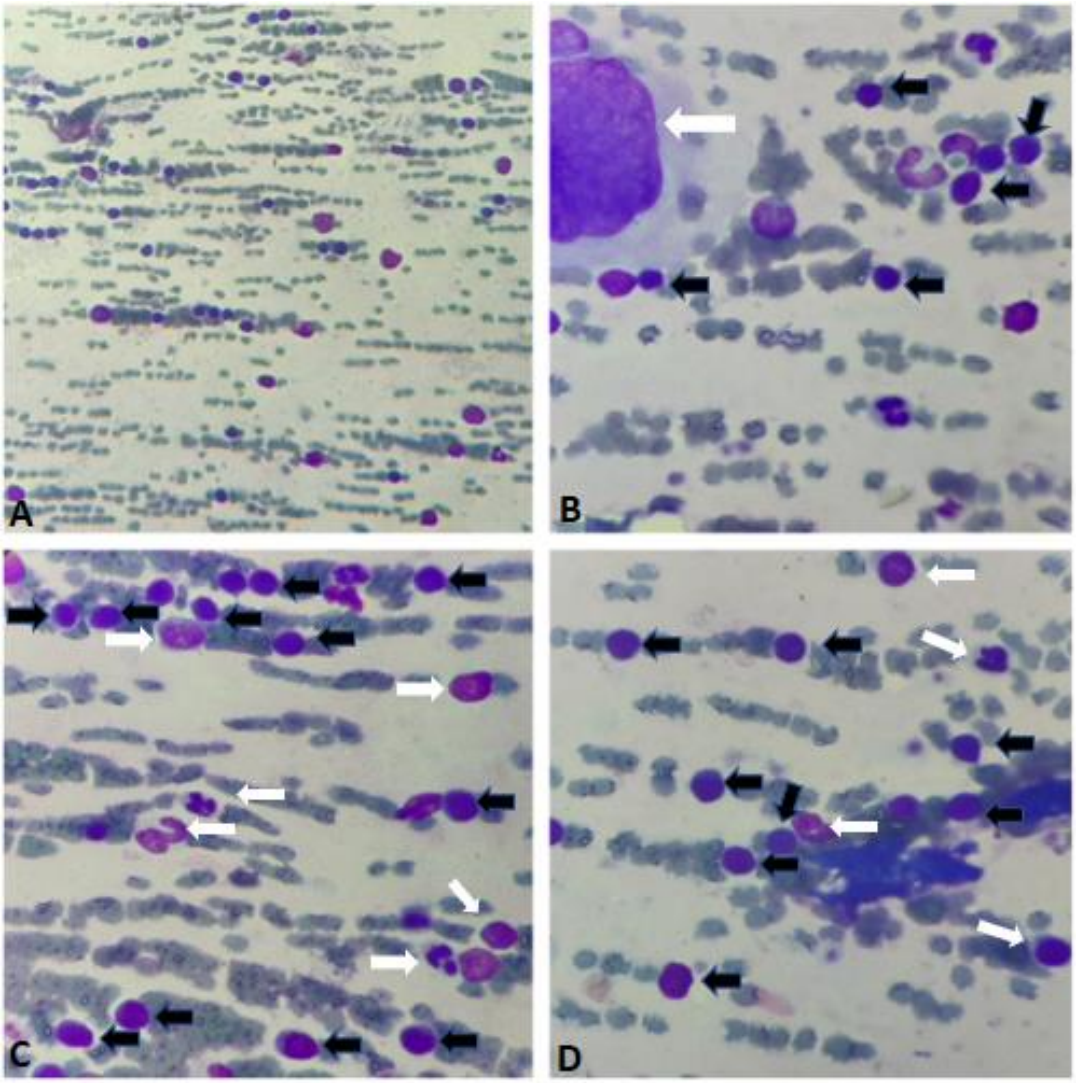

Figura 3 – Fotomicroscopia de aspirado de medula óssea de felino, portador de FeLV, apresentando leucemia linfocítica crônica. Além da hiperplasia da série linfoide (71% de linfócitos maduros na medula óssea), paciente também apresentava leucocitose por linfocitose em sangue periférico (82.000/mm³). A) Aumento original 400x. B) Evidenciação de um megacariócito (seta branca) e inúmeros linfócitos maduros (setas pretas). Aumento original 1000x. C e D) Grande proporção de linfócitos maduros (setas pretas) em relação a outras células medulares (setas brancas). Aumento original 1000x. Coloração: Panótico rápido.
Fonte: Os autores.

Outras condições associadas a infecção pelo FeLV são alterações reprodutivas, onde gatas gestantes podem apresentar reabsorção fetal, aborto ou nascimento dos filhotes com posterior morte, em decorrência da infecção intrauterina pelo FeLV (HARTMANN, 2012). Linfadenomegalia periférica, enterites crônicas e neuropatias também são condições relatadas em gatos virêmicos (LUTZ et al., 2009). Outras condições podem ser encontradas em gatos portadores do FeLV, destacando que qualquer sinal de doença em gatos pode ser indicativo da infecção (LITTLE et al., 2020).

2.6 DIAGNÓSTICO VIRAL

O diagnóstico da leucemia viral felina é complexo e não deve ser baseado na realização de apenas um teste diagnóstico, em um único momento do tempo (WESTMAN et al., 2019). Sendo recomendada a associação de exames com diferentes metodologias, pois isso permitirá o reconhecimento de qual fase da infecção pelo FeLV o paciente se encontra caso ele seja portador do vírus (CATTORI et al., 2009).

Infecções precoces pelo FeLV podem ser identificadas por meio da detecção do RNA viral no plasma e na saliva de gatos, após uma semana de infecção, enquanto que a presença da proteína p27 no sangue ocorre apenas depois da terceira semana. Sendo assim, a detecção do FeLV na saliva pode funcionar como marcador precoce de infecção, mesmo em gatos sem viremia detectável (CATTORI et al., 2009).

Para o diagnóstico de infecções progressivas pelo FeLV ainda é recomendada a triagem inicial por meio da detecção do antígeno solúvel p27 utilizando testes rápidos (FIGURA 4) (LITTLE et al., 2020). Estes testes podem ser realizados a partir do soro, plasma ou sangue total, não devendo ser utilizadas amostras de lágrimas ou saliva, pois as sensibilidades relatadas são baixas (LITTLE et al., 2020), visto que é necessária a infecção das células epiteliais para que o vírus seja detectado nessas secreções (KENNEDY; LITTLE, 2012). Atualmente é a forma de diagnóstico da doença mais empregada clinicamente, e seu resultado não é influenciado pela imunidade materna ou vacinação, e os gatos podem ser testados durante qualquer período da vida (LITTLE et al., 2020).

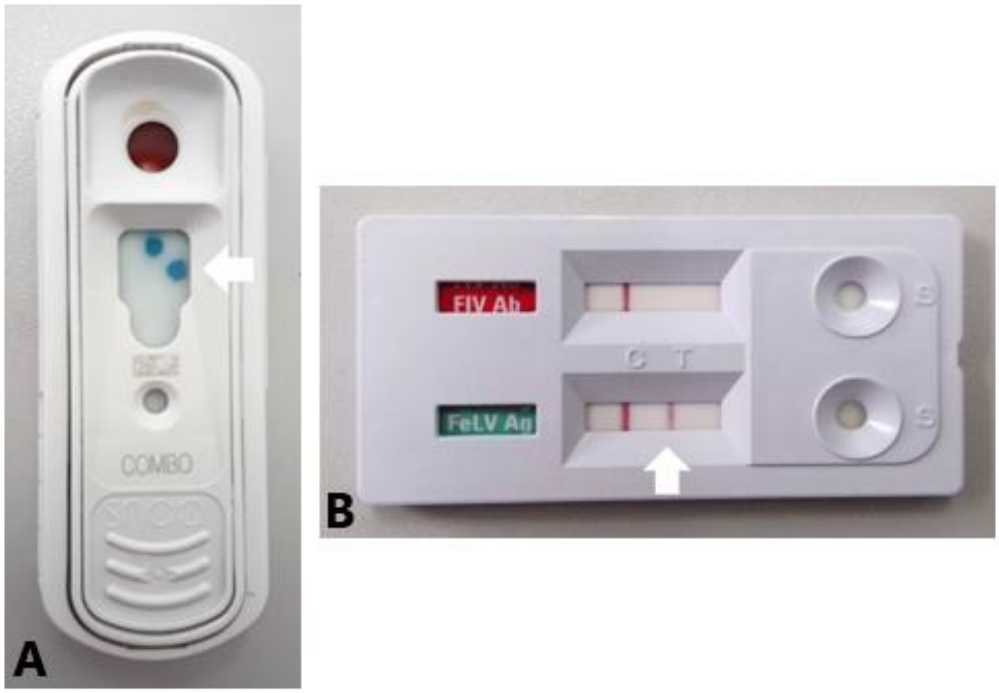

Figura 4 – Representação de dois testes rápidos de diferentes fabricantes e comercializados no Brasil. A) - SNAP FIV/FeLV Combo, Idexx; B) FIV Ac/FeLV Ag Test Kit, Alere. Estes testes são utilizados para a detecção de antígenos p27 do FeLV e de anticorpos do FIV (*Feline Immunodeficiency Virus*) em gatos. Ambos os testes indicam resultado positivo (seta) para o FeLV das amostras testadas.
Fonte: Os autores.

A positividade de um teste rápido pode impactar no futuro do animal, e desta forma, não devem ser interpretados de forma isolada. Portanto, para resultados positivos, recomenda-se a confirmação com um teste adicional, podendo este ser: ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA); detecção de provírus FeLV por PCR (*polymerase chain reaction*) (LITTLE et al., 2020); ou uso de teste de antígeno p27 de marca diferente da usada anteriormente (LITTLE et al., 2020; WESTMAN et al., 2017), o que minimiza o risco da ocorrência de falso-positivo (WESTMAN et al., 2017).

Gatos com resultados negativos, mas que potencialmente podem ter sido expostos a infecção recente, devem ser retestados em 30 dias, visto que o desenvolvimento de viremia pode demorar mais em alguns animais (LITTLE et al., 2020). Gatos com sinais consistentes relacionados a infecção, mas que testam negativo, também podem ser submetidos a detecção do provírus do FeLV (WESTMAN et al., 2017).

Pacientes que apresentarem positividade no teste de triagem e no exame adicional, são classificados como portadores progressivos ou virêmicos. E geralmente são gatos que apresentarão resultados persistentemente positivos em todos as análises a que forem submetidos a qualquer momento, como: detecção do antígeno p27, isolamento do RNA viral no plasma e

detecção do DNA proviral (CATTORI et al., 2009). Além disso, estes gatos geralmente apresentam altos níveis de provírus e antígenos no sangue (LITTLE et al., 2020).

Em infecções regressivas, os gatos comumente apresentam baixos níveis de DNA viral de forma persistente ou transitória no sangue (TORRES; MATHIASON; HOOVER, 2005). Os níveis de antígenos livres e de provírus do FeLV nesses animais podem variar de acordo com o estado imunológico do gato, e desta forma, resultados discordantes podem ocorrer entre retestagens. Alguns gatos podem inicialmente apresentar resultados positivos no teste de detecção do antígeno viral e no PCR de DNA proviral, e cerca de 16 semanas após, podem transitar para infecção regressiva (LITTLE et al., 2020).

E os gatos que cursam infecções abortivas, não apresentarão antígeno viral ou DNA proviral em nenhum momento que forem testados (TORRES; MATHIASON; HOOVER, 2005). A única forma de saber que estes animais estabeleceram contato com o FeLV é devido a presença de anticorpos no sangue, os quais também podem estar presentes em gatos vacinados para esse vírus, e desta forma, não é um método muito utilizado na rotina clínica (HARTMANN, 2012).

Todos os gatos devem ser investigados quanto a seu estado retroviral no momento em que são adquiridos, antes do início de protocolos vacinais, após possíveis exposições a gatos infectados ou gatos que exibam sinais clínicos de doença. Gatos com resultados discordantes devem ser considerados como potenciais fontes de infecção, até o esclarecimento de seu *status* (LITTLE et al., 2020).

2.7 TRATAMENTO ANTIVIRAL

Dentre os medicamentos antivirais atualmente conhecidos, a grande maioria foi desenvolvida com o intuito de serem utilizados no tratamento do vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus* - HIV). Apesar do FeLV pertencer a mesma família do HIV, são vírus de gêneros distintos, o que possivelmente confere as diferenças quanto a patogenicidade entre eles (GREGGS et al., 2012). A principal característica que os difere, é que o FeLV tem o potencial de infectar células-tronco da medula óssea. Uma vez que isso ocorre, o genoma viral se integra ao DNA das células-tronco, fazendo com que as células linfoides originadas desses precursores estejam infectadas pelo FeLV, dificultando o desenvolvimento de tratamentos eficientes contra este vírus (TAVARES et al., 1987).

A zidovudina ou azidotimidina (AZT) é um análogo nucleosídeo e foi um dos primeiros antirretrovirais estudados para o tratamento da FeLV (TAVARES et al., 1987), atuando na

inibição da síntese do ácido nucleico pela inibição da transcriptase reversa (YEN; COEN, 2010). Sua principal característica é bloquear o alongamento adicional da cadeia de DNA, o que impede a inserção do DNA viral no genoma da célula hospedeira, não havendo, por conseguinte, a replicação viral intracelular, no entanto, não exibe efeito sobre partículas virais livres (TAVARES et al., 1987).

Sua eficácia *in vitro* foi demonstrada (MUKHERJI; AU; MATHES, 1994; TAVARES et al., 1987), porém, seu efeito *in vivo* foi dependente do tempo de início de tratamento pós-infecção, mostrando-se melhor como agente profilático, que terapêutico, pois o AZT parece desempenhar efeito protetivo para com as células da medula óssea, impedindo sua infecção. Porém, se esta já está comprometida, dificilmente conseguirá debelar a infecção estabelecida (TAVARES et al., 1987), mas, aparentemente é capaz de reduzir a antigenemia em gatos infectados naturalmente (HARTMANN et al., 1992).

Outros análogos nucleosídeos foram estudados, entre eles a zalcitabina e a didanosina. A zalcitabina apresentou boa eficácia *in vitro*, e conseguiu prevenir a infecção de células linfoides e da medula óssea pelo FeLV, no entanto, as doses que poderiam impedir a infecção da medula óssea *in vivo* foram extremamente tóxicas (POLAS et al., 1990). Ao passo que a didanosina também apresentou atividade *in vitro* contra o FeLV sugerida (MUKHERJI; AU; MATHES, 1994), porém, sua eficácia *in vivo* ainda não foi comprovada.

Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos como o adenofovir foram capazes de impedir o desenvolvimento de viremia persistente em infecções controladas (HOOVER et al., 1991), e aparentemente reduzir a antigenemia em infecções naturais, no entanto, os distúrbios hematológicos oriundos de seu uso, inviabilizavam seu uso de forma prolongada (HARTMANN et al., 1992).

O raltegravir foi o primeiro inibidor de integrase liberado para uso clínico em pacientes portadores do HIV (RACHID; SCHECHTER, 2017). As integrases são enzimas codificadas pelo gene *pol* (polimerase), e responsáveis pela integração do provírus ao DNA cromossômico (QUINN et al., 2005).

Sua atividade *in vitro* foi evidenciada, tornando-o uma opção promissora para o uso *in vivo* em gatos portadores de retroviroses (CATTORI; WEIBEL; LUTZ, 2011). A administração a curto prazo aparentemente foi segura em gatos, não gerando efeitos colaterais (BOESCH et al., 2015), mesmo sendo um fármaco metabolizado por glucuronidação, pois, possivelmente a enzima responsável pela glucuronidação do raltegravir em humanos (KASSAHUN et al., 2007), é diferente da do gato. Contudo, o tratamento a curto prazo não foi suficiente para

eliminar infecções progressivas já estabelecidas, e a carga viral se reestabeleceu após a interrupção do medicamento (BOESCH et al., 2015).

O interferon-α humano foi um antiviral muito estudado quanto ao seu efeito inibitório contra o FeLV. Sua eficácia *in vitro* foi relatada (JAMESON; ESSEX, 1983), e posteriormente, estudos avaliando sua eficácia *in vivo* foram desenvolvidos. Tutores que administraram interferon-α em seus gatos não perceberam melhora clínica (MCCAW et al., 2001), bem como, não houve melhora em parâmetros hematológicos (KÖLBL et al., 2000). Também não foi capaz de eliminar a viremia dos pacientes (GOMEZ-LUCIA et al., 2019; KÖLBL et al., 2000; MCCAW et al., 2001), e apesar de proporcionar diminuição na carga proviral e de antígenos do FeLV, após a interrupção do tratamento estes valores voltaram a subir (GOMEZ-LUCIA et al., 2019). O interferon-ω felino também não promoveu a extinção da infecção em gatos infectados naturalmente (GIL et al., 2013).

O estudo das aplicações clínicas da ribavirina como antiviral no tratamento de gatos apresentou limitações, visto que seu uso foi associado a grave toxicidade na espécie (WEISS; COX; BOUDREAUX, 1993).

Recentemente, uma proteína quimérica recombinante (RetroMAD1™) teve seu uso estudado em gatos sintomáticos portadores do FeLV. Aparentemente, ela aumentou o tempo de sobrevida dos animais do estudo, no entanto, não foi capaz de eliminar a infecção da medula óssea (HUAN; SILVA; FLORIANO, 2019).

Até o momento, ainda não foram identificados fármacos capazes de eliminar a viremia persistente pelo FeLV. Desta forma, gatos positivos devem ser acompanhados para o diagnóstico precoce de síndromes clínicas que o vírus pode induzir no paciente, bem como outras doenças não relacionadas a infecção, e o tratamento direcionado para cada comorbidade (KENNEDY; LITTLE, 2012).

2.8 PREVENÇÃO

A identificação de gatos infectados pelo FeLV por meio da testagem e a separação de gatos positivos de negativos, configuram as principais estratégias de prevenção contra a perpetuação da infecção, junto a vacinação de gatos negativos (LITTLE et al., 2020; WESTMAN et al., 2019). Possivelmente, a associação destas medidas permitiu a diminuição da prevalência do FeLV em algumas regiões do mundo (LITTLE et al., 2020).

Em 2016, a vacinação contra o FeLV foi considerada uma prática não essencial, principalmente quando o risco de infecção não estava presente ou em locais onde a prevalência da doença era considerada baixa (DAY et al., 2016).

No entanto, em 2020, a *American Association of Feline Practitioners* recomendou a vacinação contra o FeLV de todos os gatos com menos de 1 ano de idade, visto que o estilo de vida do gato pode mudar ao longo de sua vida, bem como seu risco de exposição. Além disso, essa faixa etária é a mais suscetível a infecção, principalmente quanto ao desenvolvimento da forma progressiva, que pode produzir quadros graves e até mesmo a morte dos infectados (LITTLE et al., 2020).

A vacinação de gatos adultos que apresentam estilo de vida ou risco de exposição elevados ao FeLV, também foi recomendada (DAY et al., 2016; LITTLE et al., 2020), principalmente aqueles com acesso a ambientes externos, ou que serão alojados em grupos de gatos com *status* retroviral desconhecido (WESTMAN et al., 2019).

Desta forma, devem ser vacinados contra FeLV, gatos saudáveis e com teste negativo para a doença, e o esquema vacinal em filhotes pode ser iniciado a partir da oitava semana de vida, com segunda dose após 3 a 4 semanas. Uma dose de reforço deve ser administrada um ano após este protocolo inicial, e a periodicidade das próximas revacinações deve ser estabelecida pelo médico veterinário, como base no risco de exposição de cada gato (DAY et al., 2016).

As vacinas devem ser administradas por via subcutânea e o mais distal possível no membro pélvico esquerdo ou outro local que permita abordagem cirúrgica, como a região abdominal lateral (DAY et al., 2016), visto que associada a vacinação, também há o risco do desenvolvimento de sarcomas em sítio de injeção (LUTZ et al., 2009).

A proteção induzida pela vacina a gatos desafiados a infecção natural é considerada satisfatória (LUTZ et al., 2009), e sua eficácia independe de ser uma vacina recombinante sem adjuvante ou inativada com adjuvante (GROSENBAUGH et al., 2017). No entanto, gatos portadores de FIV, aparentemente não respondem tão bem a vacinação contra FeLV, havendo falha na promoção de imunidade protetora (BANDECCHI et al., 2006).

Gatos infectados pelo FeLV que se encontrem bem clinicamente, também podem ser vacinados contra outras enfermidades (DAY et al., 2016). Aparentemente, o *status* FeLV positivo não influencia negativamente na eficácia e segurança da vacinação de gatos assintomáticos contra o parvovírus felino, havendo o desenvolvimento de anticorpos protetores (BERGMANN et al., 2019).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A leucemia viral felina é uma doença comum em algumas localidades, e muitas vezes negligenciada pelos médicos veterinários. Apesar dos esforços na identificação de um medicamento eficaz para o tratamento da infecção pelo FeLV, nenhum ainda é capaz de eliminar o vírus do hospedeiro. Desta forma, a conscientização de tutores para a implementação de medidas preventivas como a testagem e separação de gatos positivos, e a vacinação dos gatos negativos contra o FeLV, pode auxiliar na diminuição da prevalência da doença em áreas endêmicas.

4 REFERÊNCIAS

ANAI, Y. et al. Infectious endogenous retroviruses in cats and emergence of recombinant viruses. **Journal of Virology**, Washington, v. 86, n. 16, p. 8634-8644, 2012.

ANDERSON, M. M. et al. Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus. **Science**, Washington, v. 287, n. 5459, p. 1828-1830, 2000.

BANDECCHI, P. et al. Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. **Veterinary Record**, London, v. 158, n. 16, p. 555-557, 2006.

BENVENISTE, R. E.; SHERR, C. J.; TODARO, G. J. Evolution of type C viral genes: origin of feline leukemia virus. **Science**, Washington, v. 190, n. 4217, p. 886-888, 1975.

BERGMANN, M. et al. Antibody response to feline panleukopenia virus vaccination in cats with asymptomatic retrovirus infections: a pilot study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 21, n. 12, p. 1094-1101, 2019.

BIEZUS, G. et al. Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 63, p. 17-21, 2019.

BOEKE, J. D.; STOYE, J. P. Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. In: COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, H. E. **Retroviruses**. 1. ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. p. 343-436.

BOESCH, A. et al. Evaluation of the effect of short-term treatment with the integrase inhibitor raltegravir (Isentress) on the course of progressive feline leukemia virus infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 175, n. 2-4, p. 167-178, 2015.

CALAZANS, S. G.; DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. Linfomas. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 633-648.
CATTORI, V. et al. The kinetics of feline leukaemia virus shedding in experimentally infected cats are associated with infection outcome. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 133, n. 3, p. 292-296, 2009.

CATTORI, V.; WEIBEL, B.; LUTZ, H. Inhibition of feline leukemia virus replication by the integrasse inhibitor Raltegravir. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 152, n. 1-2, p. 165-168, 2011.

CHIU, E. S.; HOOVER, E. A.; VANDEWOUDE, S. A. Retrospective examination of feline leukemia subgroup characterization: viral interference assays to deep sequencing. **Viruses**, Basel, v. 10, n. 1, p. 29, 2018.

CONG, W. et al. *Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, feline immunodeficiency virus (FIV), and feline leukemia virus (FeLV) infections in stray and pet cats (*Felis catus*) in northwest China: co-infections and risk factors. **Parasitology Research**, Berlin, v. 115, n. 1, p. 217-223, 2015.

CRISTO, T. G. et al. Feline lymphoma and a high correlation with feline leukaemia virus infection in Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 166, p. 20-28, 2019.

DAY, M. J. et al. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 4-8, 2016.

DONAHUE, P. R. et al. Viral genetic determinants of T-cell killing and immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 4461-4469, 1991.

FROMONT, E. et al. Prevalence and pathogenicity of retroviroses in wildcats in France. **Veterinary Record**, London, v. 146, n. 11, p. 317-319, 2000.

GIL, S. et al. Relevance of feline interferon omega for clinical improvement and reduction of concurrent viral excretion in retrovirus infected cats from a rescue shelter. **Research in Veterinary Science**, London, v. 94, n. 3, p. 753-763, 2013.

GOMEZ-LUCIA, E. et al. Follow-up of viral parameters in FeLV- or FIV-naturally infected cats treated orally with low doses of human interferon alpha. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 9, p. 845, 2019.

GREGGS, W. M. et al. Discovery of drugs that possess activity against feline leukemia vírus. **Journal of General Virology**, London, v. 93, n. 4, p. 900-905, 2012.

GROSENBAUGH, D. A. et al. Efficacy of a nonadjuvanted recombinant FeLV vaccine and two inactivated FeLV vaccines when subject to consistent virulent FeLV challenge conditions. **Biologicals**, London, v. 49, p. 76-80, 2017.

HARTMANN, K. Feline leukemia virus infection. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012. p. 108-136.

HARTMANN, K. et al. Use of two virustatica (AZT, PMEA) in the treatment of FIV and of FeLV seropositive cats with clinical symptoms. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 35, n. 1-2, p. 167-175, 1992.

HOOVER, E. A. et al. Early therapy of feline leukemia virus infection (FeLV-FAIDS) with 9-(2-phosphonyl-methoxyethyl) adenine (PMEA). **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 77-92, 1991.

HOVET/UFES – Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo. **Linfoma em gatos**. Arquivos do Serviço de Clínica Médica e Cirúrgica. 2020. 3 fotografias.

HUAN, U. E.; SILVA, P. M. F.; FLORIANO, A. P. Case studies on RetroMAD1™, an orally administered recombinant chimeric protein to treat naturally infected feline leukemia virus (FeLV) cats. **Archives of Veterinary Science and Medicine**, Houston, v. 2, n. 4, p. 41-57, 2019.

JAMESON, P.; ESSEX, M. Inhibition of feline leukemia virus replication by human leukocyte interferon. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 115-120, 1983.

JARRETT, O. et al. The frequency of occurrence of feline leukaemia virus subgroups in cats. **International Journal of Cancer**, New York, v. 21, n. 3, p. 334-337, 1978.

JARRETT, O.; RUSSELL, P. H. Differential growth and transmission in cats of feline leukaemia viruses of subgroups A and B. **International Journal of Cancer**, New York, v. 21, n. 4, p. 466-472, 1978.

JARRETT, W. et al. Horizontal transmission of leukemia virus and leukemia in the cat. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 51, n. 3, p. 833-841, 1973.

JARRETT, W. F. H. et al. Leukæmia in the cat: a virus-like particle associated with leukæmia (lymphosarcoma). **Nature**, London, v. 202, p. 567-568, 1964.

KASSAHUN, K. et al. Metabolism and disposition in humans of raltegravir (MK-0518), an anti-AIDS drug targeting the human immunodeficiency virus 1 integrase enzyme. **Drug Metabolism and Disposition**, Rockville, v. 35, n. 9, p. 1657-1663, 2007.

KENNEDY, M.; LITTLE, S. E. Viral diseses. In: LITTLE, S. E. **The cat – clinical medicine and management**. 1. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012. p. 1029-1070.

KÖLBL, S. et al. Effects of long term low dose interferon α in cats persistently infected with FeLV. **Kleintierpraxis**, Baden, v. 45, n. 7, p. 497-510, 2000.

LEE, I. T. et al. Prevalence of feline leukaemia virus infection and serum antibodies against feline immunodeficiency virusin unowned free-roaming cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 220, n. 5, p. 620-622, 2002.

LITTLE, S. et al. 2020 AAFP feline retrovirus testing and management guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 22, n. 1, p. 5-30, 2020.

LUTZ, H. et al. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 11, n. 7, p. 565-574, 2009.

MCCAW, D. et al. Immunomodulation therapy for feline leukemia virus infection. **Journal of the American Animal Hospital Association**, South Bend, v. 37, n. 4, p. 356-363, 2001.

MIYAKE, A. et al. Novel feline leukemia virus interference group based on the *env* gene. **Journal of Virology**, Washington, v. 90, n. 9, p. 4832-4837, 2016.

MUKHERJI, E.; AU, J. L.; MATHES, L. E. Differential antiviral activities and intracellular metabolism of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine in human cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 38, n. 7, p. 1573-1579, 1994.

NESINA, S. et al. Retroviral DNA-the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats. **Retrovirology**, London, v. 12, n. 1, p. 105, 2015.

NISOLE, S.; SAÏB, A. Early steps of retrovirus replicative cycle. **Retrovirology**, London, v. 1, n. 1, p. 9, 2004.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2005.

POLAS, P. J. et al. *In Vitro* and *in vivo* evidence that the antiviral activity of 2',3'-dideoxycytidine is target cell dependent in a feline retrovirus animal model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 34, n. 7, p. 1414-1421, 1990.

RACHID, M.; SCHECHTER, M. **Manual de HIV / AIDS**. 10. ed. Rio de Janeiro: Thieme Revinter Publicações Ltda, 2017.

RICKARD, C. G. et al. C-type virus particles in spontaneous lymphocytic leukemia in a cat. **The Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 57, n. 2, p. 302-307, 1967.

RIGBY, M. A. et al. Partial dissociation of subgroup C phenotype and *in vivo* behaviour in feline leukaemia viruses with chimeric envelope genes. **Journal of General Virology**, London, v. 73, n. 11, p. 2839-2847, 1992.

ROJKO, J. L. et al. Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 63, n. 3, p. 759-768, 1979.

SIVAGURUNATHAN, A.; ATWA, A. M.; LOBETTI, R. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection in Malaysia: a retrospective study. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, London, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2018.

STAVISKY, J.; DEAN, R. S.; MOLLOY, M. H. Prevalence of and risk factors for FIV and FeLV infection in two shelters in the United Kingdom (2011–2012). **Veterinary Record**, London, v. 181, n. 17, p. 451-460, 2017.

STEWART, M. A. et al. Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viroses. **Journal of Virology**, Washington, v. 58, n. 3, p. 825-834, 1986.

TATYANA, M. et al. The prevalence of Felv and Fiv infection in cats and hematological changes and clinical signs in Felv/Fiv infected cats from Vladivostok, Russia. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, Pakistan, v. 7, n. 7, p. 570-573, 2019.

TAVARES, L. et al. 3'-azido-3'-deoxythymidine in feline leukemia virus-infected cats: A model for therapy and prophylaxis of AIDS. **Cancer Research**, Baltimore, v. 47, n. 12, p. 3190-3194, 1987.

TORRES, A. N.; MATHIASON, C. K.; HOOVER, E. A. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. **Virology**, New York, v. 332, n. 1, p. 272-283, 2005.

WEISS, R. C.; COX, N. R.; BOUDREAUX, M. K. Toxicologic effects of ribavirin in cats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 301-316, 1993.

WESTMAN, M. E. et al. Seroprevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in Australia: risk factors for infection and geographical influences (2011–2013). **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, London, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2016.

WESTMAN, M. E. et al. Comparison of three feline leukaemia virus (FeLV) point-of-care antigen test kits using blood and saliva. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 50, p. 88-96, 2017.

WESTMAN, M. et al. The diagnosis of feline leukaemia virus (FELV) infection in owned and group-housed rescue cats in Australia. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 6, p. 503-526, 2019.

YEN, R. W.; COEN, D. M. Farmacologia das infecções virais. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN JR, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia - a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2010. p. 609-630.

Principais agentes infecciosos em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*)

Adriano Lima Stelzer Bindaco[1]
Cesar Oliveira Liesner[2]
Louisiane de Carvalho Nunes[3]

[1] Universidade Vila Velha, e-mail: adrianostelzer48@gmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: cesarliesner01@hotmail.com
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: louisianecn@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

As tartarugas marinhas surgiram no período Jurássico e representam uma das linhagens mais antigas da Classe Reptilia atual. Por pertencerem à Ordem Testudines, apresentam o corpo protegido por casco rígido constituído de carapaça convexa dorsal e plastrão achatado ventral. As estruturas são formadas por uma camada externa de queratina e uma camada interna óssea, originada da fusão dos ossos da coluna vertebral, costelas e pelve (PRITCHARD; MORTIMER, 1999). Atualmente há sete espécies de tartarugas marinhas distribuídas amplamente por todos os oceanos do mundo, tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*), tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), tartaruga-de-pente (*Eretmochelys imbricata*), tartaruga-de-kemp (*Lepidochelys kempii*), tartaruga-de-oliva (*Lepidochelys olivacea*), tartaruga-marinha-australiana (*Natator depressus*) e tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*) (PRITCHARD; MORTIMER, 1999; SANTOS et al., 2011).

A tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) é a espécie de tartaruga marinha com maior número de exemplares nos mares do Brasil, habita geralmente regiões mais próximas a costa e é encontrada desde os trópicos até as zonas temperadas (SANTOS et al., 2011).

Assim como todas as demais espécies de tartarugas marinhas, *C. mydas* é considerada uma espécie ameaçada de extinção em escala mundial, sendo classificada como “Vulnerável” (VU) no Brasil e no âmbito internacional como “Em perigo” (EN) (IUCN, 2020). A principal ameaça à vida desses testudíneos é de origem antrópica, com destaque para poluição dos mares e atividade pesqueira (SANTOS et al., 2011). Entretanto doenças virais, bacterianas, parasitárias e fúngicas também representam importantes ameaças para vidas das tartarugas-verdes (BAPTISTOTTE, 2014).

Em répteis, uma característica importante das infecções, principalmente bacterianas e fúngicas, é a formação de exsudato branco-amarelado e friável, denominado cáseo. Microscopicamente, é caracterizado pelo acúmulo de heterófilos degranulados e degenerados (MONTALI, 1988).

Neste contexto, objetivou-se realizar uma revisão de literatura sobre os principais agentes infecciosos diagnosticados em *C. mydas*, com o intuito de evidenciar os microrganismos mais frequentes na espécie, bem como suas principais lesões, a fim de se contribuir para o acervo literário sobre testudíneos marinhos.

2 TARTARUGA-VERDE (*Chelonia mydas*)

A tartaruga-verde ou aruanã (*Chelonia mydas*) habita águas tropicais e subtropicais dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. É a espécie de tartaruga marinha com maior população nos mares do Brasil. Apresentam cabeça pequena e arredondada, com bico ligeiramente serrilhado. O plastrão é de coloração branca em filhotes e amarelada nos adultos, e na extremidade das longas nadadeiras há a presença de uma unha. Sua carapaça é larga, ovalada e coberta por placas justapostas de queratina (cinco centrais e quatro pares laterais), de coloração castanha esverdeada ou acinzentada, que em filhotes varia de marrom a negro. As estruturas também estão presentes na região pré-frontal (um par) e na região pós-orbital (dois pares) (PRITCHARD; MORTIMER, 1999) (FIGURA 1).

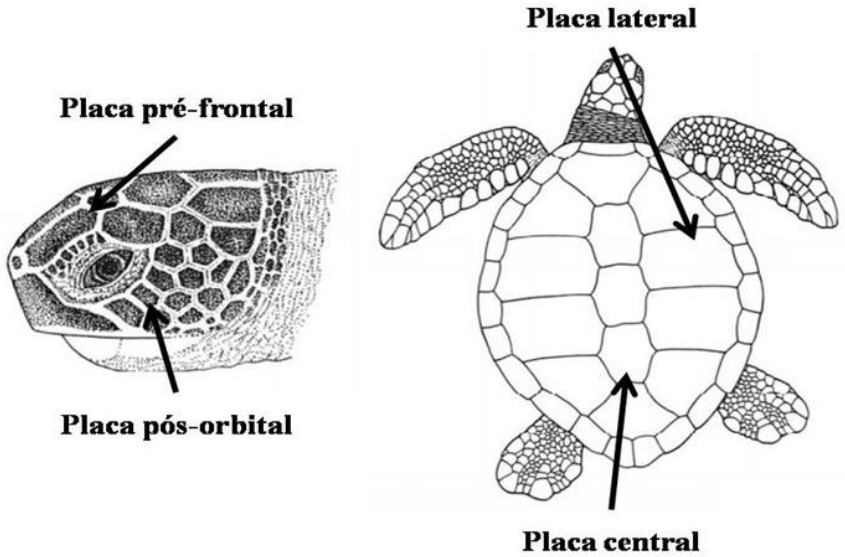

Figura 1 – Desenho esquemático da distribuição anatômica das placas de queratina em tartaruga-verde (*Chelonia mydas*).
Fonte: Adaptado de Pritchard e Mortimer (1999).

Seu ciclo de vida é longo e complexo. Os filhotes nascem com 25 g e após uma semana, tornam-se juvenis, e permanecem nesta fase até a carapaça alcançar 40 cm de comprimento, daí em diante passam a ser subadultos. A fase adulta é alcançada após a maturidade sexual, que ocorre entre 26 e 46 anos, quando a carapaça mede em torno de 70 a 100 cm de comprimento (HIRTH, 1997; SANTOS et al., 2011).

O acasalamento ocorre em alto mar e as fêmeas retornam à praia do seu nascimento para ovoposição. Depositam em média 122 a 125 ovos, durante o período de dezembro a junho no Brasil. Utilizam como áreas de desova as ilhas oceânicas brasileiras, como a Ilha da Trindade, a Reserva Biológica do Atol das Rocas e o Arquipélago de Fernando de Noronha, localizadas

nos estados do Espírito Santo (ES), Rio Grande do Norte (RN) e Pernambuco (PE), respectivamente. A Ilha de Trindade – ES se destaca por abrigar o maior número de desovas de *C. mydas*, com o registro de 3.500 ninhos entre os anos de 2009 a 2010 (SANTOS et al., 2011).

Quando filhote a tartaruga-verde é onívora com tendência carnívora e adquire hábito alimentar exclusivamente herbívoro a partir da fase juvenil. Alimentam-se principalmente de gramíneas marinhas e macroalgas e, devido a sua dieta, passam a maior parte do seu ciclo de vida em baías rasas e áreas próximas a costa na qual a vegetação marinha é abundante, tornando-se a espécie de tartaruga marinha a apresentar hábitos mais costeiros (BJORNDAL, 1985; ROMANINI, 2014).

Assim como todas as demais espécies de tartarugas marinhas, *C. mydas* é considerada pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), uma espécie ameaçada de extinção em escala mundial, sendo classificada como "vulnerável" (VU) no Brasil e no âmbito internacional como "em perigo" (EN) (IUCN, 2020).

Diversas causas levam à redução da população desses animais nos mares do Brasil. A principal é a ação antrópica, que causa a perda de áreas de desova e alimentação, mortalidade (interação com a pesca), além de gerar carga de resíduos não biodegradáveis e poluentes aos oceanos (SANTOS et al., 2011). Por outro lado, agentes virais, bacterianos, fúngicos e/ou parasitários podem causar infecções em diversos tecidos e órgãos e ocasionar a morte das tartarugas-verdes (BAPTISTOTTE, 2014; DOMICIANO et al., 2017).

2.1 PRINCIPAIS AGENTES INFECCIOSOS ENCONTRADOS EM TARTARUGAS-VERDES (*Chelonia mydas*)

Apesar do tegumento e o sistema imune eficiente das tartarugas marinhas reduzirem a oportunidade de microrganismos penetrarem e colonizarem os tecidos do organismo, fatores como poluição, alteração da temperatura e salinidade da água, traumatismos e/ou aspiração d'água podem predispor a infecção por agentes, oriundos da microbiota e/ou do ambiente (BAPTISTOTTE, 2014).

2.1.1 Agentes virais

Dentre os principais agentes virais de importância para *Chelonia mydas* destacam-se os da Família Herpesviridae (FIGURA 2). Herpesvírus quelônio 5 (ChHV-5) causa o desenvolvimento de neoplasias cutâneas e/ou viscerais benignas em tartarugas-verdes.

Representa ameaça crescente para a espécie, com o vírus associado a fatores ambientes como poluição do ecossistema marinho, temperatura da água, biotaxias, parasitos, genética, imunossupressão e radiação ultravioleta (MATUSHIMA et al., 2001; MONEZI et al., 2016).

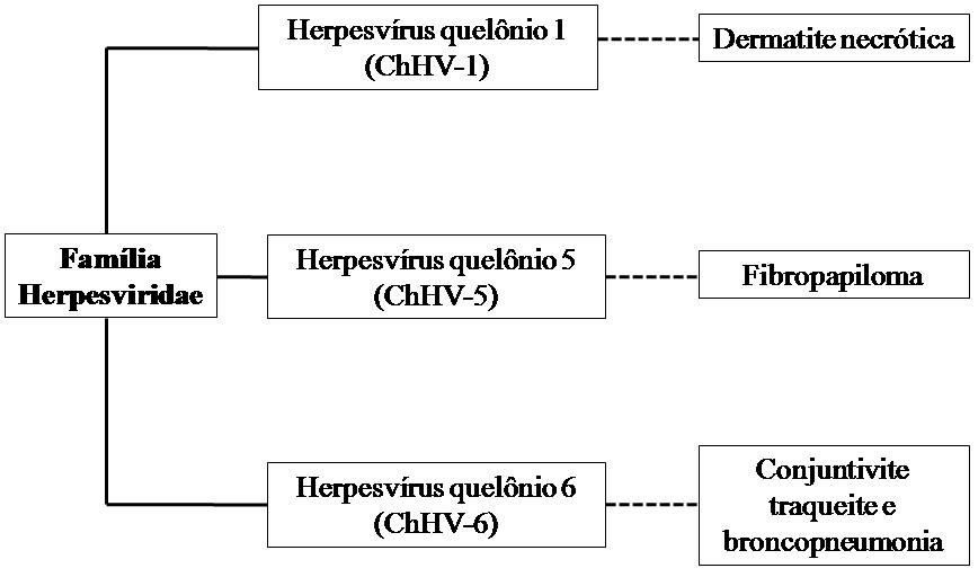

Figura 2 – Principais herpesvírus em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) e suas respectivas lesões.
Fonte: Adaptado de Domiciano et al. (2017).

Os tumores são mais comuns em nadadeiras, pescoço, cabeça, região inguinal e axilar, e base da cauda, e afetam a locomoção, alimentação, respiração, visão, e a condição geral de saúde das tartarugas, tornando-as propensas a doenças bacterianas ou parasitárias secundárias, predação e até mesmo a morte. Tartarugas com grande número de fibropapilomas podem apresentar tumores viscerais em pulmão, fígado, rins e trato gastrointestinal. Macroscopicamente, as neoplasias variam de verrucosas a lisas, sésseis ou pedunculadas (MATUSHIMA et al., 2001).

Histologicamente, os neoplasmas são classificados de acordo com o tipo de proliferação tecidual em papiloma cutâneo, quando há apenas proliferação de tecido epitelial; fibroma, quando há proliferação restrita ao tecido conjuntivo e fibropapiloma, quando se observa a proliferação de ambos os tecidos. Observa-se aumento da epiderme formando projeções papilares para derme, que apresenta abundante tecido fibrovascular. Há aumento da camada córnea da epiderme (paraqueratose), hiperplasia das células epidérmicas (acantose), degeneração das células do estrato basal, além de inclusões intracelulares eosinofílicas em queratinócitos (ZWARG et al., 2014).

Vale ressaltar que foram isolados outros vírus de fibropapilomas em tartarugas-verdes, como retrovírus, adenovírus, herpesvírus, poliomavírus e papilomavírus. No entanto, exames

moleculares como, reação de polimerase em cadeia (PCR), de fibropapilomas, sangue, secreção ocular e saliva de animais acometidos reforçam a associação da fibropapilomatose com o herpesvírus. A relação das outras espécies de vírus previamente encontradas ainda deve ser investigada, a fim de se averiguar se há associação destes microrganismos com a neoplasia (KNÖBL; REICHE; MENÃO, 2011).

Por outro lado, herpesvírus quelônio 1 (ChHV-1) está relacionado a dermatite necrótica (*gray patch disease*), principalmente em indivíduos jovens (DOMICIANO et al., 2017). A infecção tem como fatores predisponentes a alta densidade populacional e temperatura elevadas da água, por exemplo, acometendo principalmente tartarugas-verdes cativas juvenis com o desenvolvimento de dermatite, traqueites e conjuntivites (TROIANO, 2018). Enquanto que herpesvírus quelônio 6 (ChHV-6) é responsável pela virose, *lung-eye-tracheal disease* (LET), caracterizada por lesões em pulmões, traqueia e olhos, como conjuntivite caseosa, traqueite e broncopneumonia (DOMICIANO et al., 2017; GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990).

2.1.2 Agentes bacterianos

Em répteis, comumente, as infecções bacterianas são devido ao caráter patogênico e oportunista das bactérias da microbiota. Santoro et al. (2006) identificaram 10 gêneros de bactérias Gram-negativas (*Aeromonas*, *Bordetella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Vibrio*) e três de Gram-positivas (*Bacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*) em cavidade nasal e cloacal de fêmeas de *Chelonia mydas* em nidificação. O ambiente aquático também é considerado importante fonte de contaminação, devido à ampla distribuição de *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp. nesse ecossistema (PEIXOTO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2001). Nesta linha, Reis et al. (2010) evidenciaram a alta prevalência de *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp. em regiões oral, nasal e de ferimentos, em *C. mydas* juvenis.

Em tartarugas-verdes cativas é comum o desenvolvimento de doenças bacterianas secundárias associadas à imunossupressão (estresse) e trauma causados pelo cativeiro. Enquanto que, nos filhotes, o sistema imunológico ainda em desenvolvimento, torna as infecções mais frequentes e fatais (GLAZEBROOK; CAMPBELL; THOMAS 1993; VEGA-MANRIQUEZ et al., 2018).

Os patógenos bacterianos isolados a partir de lesões de *C. mydas* (cativas e de vida livre) pertencem aos gêneros *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Arizona*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Moraxella*,

Mycobacterium, Pasteurella, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Shewanella, Staphylococcus, Streptococcus e *Vibrio* (DOMICIANO et al., 2017; GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990; ORÓS; CALABUIG; DÉNIZ, 2004). *C. mydas* que vivem em cativeiro são comumente acometidas por infecções causadas principalmente por *Pseudomonas* sp., *V. alginolyticus*, *A. hydrophila*, *Flavobacterium* sp., *S. lentus*, *C. braaky* e *E. faecium*. Esses patógenos estão relacionados com estomatites, dermatites, rinites e broncopneumonias, lesões que podem ocorrer de forma concomitante nos animais (GLAZEBROOK; CAMPBELL; THOMAS, 1993; VEGA-MANRIQUEZ et al., 2018).

Os microrganismos relatados em enfermidades bacterianas em tartarugas- verdes, bem como as lesões de quais foram isolados são exibidos na tabela a seguir (TABELA 1).

Tabela 1 – Agentes etiológicos isolados de infecções em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) e seus respectivos processos patológicos, distribuídos por sistema (Continua).

Sistema/local	Processo patológico	Agentes bacterianos associados
Tegumento	Dermatite ulcerativa traumática*	*Aeromonas hydrophyla*, *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*e, *Staphylococcus spp. e Vibrio alginolyticus* (GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990; GLAZEBROOK; CAMPBELL; THOMAS, 1993; VEGA-MANRIQUEZ et al., 2018).
Osteomuscular	Osteomilete	*Flavobacterium* sp. e *V. alginolyticus* (GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990).
Endócrino	Adenite abscedativa (glândula de sal)	*P. aeruginosa* (GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990).
Respiratório	Broncopneumonia*	*A. hydrophila*, *Arizona hinshaln*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium* sp., *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*e, *V. alginolyticus* (GLAZEBROOK; CAMPBELL; THOMAS, 1993; VEGA-MANRIQUEZ et al., 2018).
	Pneumonia granulomatosa	*Mycobacterium* sp. (GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990).
	Rinite caseosa obstrutiva*	*A. hydrophila*, *Flavobacterium* sp., *P. aeruginosa P. fluorescens*e, *V. alginolyticus (*GLAZEBROOK; CAMPBELL; THOMAS, 1993; VEGA-MANRIQUEZ et al., 2018).
Digestório	Estomatite ulcerativa caseosa*	*A. hydrophila*, *Citrobacter braaky*, *E. coli*, *Enterococcus faecium*, *Flavobacterium* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. maercescens*, *S. lentus*, *Streptococcus* spp. e *V. alginolyticu*s (GLAZEBROOK; CAMPBELL; THOMAS, 1993).

Tabela 1 – Agentes etiológicos isolados de infecções em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) e seus respectivos processos patológicos, distribuídos por sistema. (Conclusão).

Sistema/local	Processo patológico	Agentes bacterianos associados
Digestório	Glossite ulcerativa caseosa	*Achromobacter* sp. e *Burkholderia capacia* (ORÓS; CALABUIG; DÉNIZ, 2004).
	Esofagite ulcerativa fibrinosa/fibrinonecrótica traumática*	*A hydrophila, E. coli, Pseudononas* spp., *Staphylococclus* spp. e *V alginolyticiis* (ORÓS; CALABUIG; DÉNIZ, 2004).
	Gastrite fibrinosa/necropulurenta	*Proteus* spp., *Staphylococcus* spp. e *V. alginolyticus* (ORÓS; CALABUIG; DÉNIZ, 2004; ORÓS et al., 2005).
	Enterite catarral/fibrinonecrótica necropulurenta	*Bacillus spp., E. coli, Pasteurella spp., Proteus spp., S. marcescens, Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. *e V. alginolyticus* (ORÓS et al., 2005).
	Abscessos e granulomas intestinais	*Bacillus* spp., *E. coli, Pasteurella* spp., *Proteus* spp., *Serratia marcescens, Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. *e V. alginolyticus* (ORÓS et al., 2005).
	Serosite fibrinosa	*Bacillus* spp., *E. coli, Pasteurella* spp., *Proteus* spp., *S. marcescens, Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. *e V. alginolyticus* (ORÓS CALABUIG; DÉNIZ, 2004; ORÓS et al., 2005).
Fígado	Hepatite granulomatosa necrotizante	*A. hydrophila, Citrobacter* sp., *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp. e *V. alginolyticus* (ORÓS et al., 2005).
Ocular	Blefarite ulcerativa caseosa	*Achromobacter* sp., *B. capacia, Flavobacterium* sp. e *P. aeruginosa* (GLAZEBROOK; CAMPBELL; THOMAS, 1993).
Celoma	Celomite	*Citrobacter amalomaticos e C. freundii* (GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990).

*Infecções comumente associadas ao trauma e/ou imunossupressão ocasionados pelo cativeiro.
Fonte: Os autores.

2.1.3 Agentes parasitários

As tartarugas-verdes são comumente infectadas por endoparasitos e são consideradas a espécie de tartaruga marinha com a maior abundância média e riqueza de helmintos (BINOTI et al., 2016). A alimentação é um dos meios mais prováveis de infecção. Acredita-se que os hospedeiros intermediários dos parasitos utilizam as algas marinhas como possível substrato para o seu desenvolvimento. Além disso, durante a transição de filhote para juvenil, *C. mydas*

adquire hábito alimentar herbívoro, e passa a habitar regiões mais costeiras. Nesse contexto, essas alterações podem levar a imunossupressão, ao mesmo tempo, que os animais entram em contato com novas formas infectantes, até então desconhecidas (SANTORO; MORALES; RODRÍGUES-ORTIZ, 2007; WERNECK, 2011).

Os parasitos consomem sangue, tecidos sólidos e/ou nutrientes, e causam necrose tecidual, obstrução do trato gastrointestinal, produção de toxinas e reações inflamatórias. A constituição da carga parasitária pode ser influenciada pela imunidade, dieta e habitat do hospedeiro, densidade populacional, e processos migratórios (KLINGENBERG, 2007).

Aproximadamente 30 espécies de trematodas foram descritos em tartarugas-verdes. As espécies predominantes pertencem a Classe Trematoda, com destaque para *Cricocephalus albus* (estômago e intestino delgado), *Metacetabulum invaginatum* (estômago, intestino delgado e intestino grosso), *Neoctangium travassosi* (intestino delgado e intestino grosso), *Pronocephalus obliquus* e *Pleurogonius longiusculus*, que parasitam todas as porções do trato gastrointestinais citadas, além do fígado (BINOTI et al., 2016; GOMES et al., 2017; WERNECK, 2011).

Ovos e parasitos adultos da família Spirorchiidae são causas de lesões cardiovasculares em tartarugas-verdes. O parasito fixa-se no endocárdio e/ou permanece livre dentro das câmaras e vasos cardíacos, e pode disseminar para vários outros órgãos. A espécie mais comum é *Learedius learedi*, que possui predileção por vasos sanguíneos, ocorrendo em diversos órgãos, como pulmão, fígado e baço (WERNECK et al., 2006).

Em um estudo realizado em 40 tartarugas-verdes, Santoro, Morales e Rodrígues-Ortiz (2007) observaram 39 dos animais parasitados, com a ocorrência de 1192 espirorquoides, entre eles *L. learedi* (1024), *Hapalotrema postorchis* (159), *Monticellius indicum* (8) e *Amphiorchis solus* (1). Os mesmos autores observaram em 36 indivíduos endocardite mural necrosante por *L learedi*, além de dois animais com aneurismas por *H. postorchis*, sendo que um deles apresentava formação de trombo e obstrução vascular.

Rameshwarotrema uterocrescens, identificado em glândulas esofágicas, foi relacionado com inflamação caseosa e ulcerativa do esôfago de tartarugas-verdes associado a infecção bacteriana secundária da microbiota (RIBEIRO et al., 2017; SANTORO et al., 2007). No entanto, Calais Júnior (2015) verificou a ocorrência de lesões caseosas em esôfago de *C. mydas*, e associou a doença a quatro famílias diferentes de trematodas (Pronocephalidae, Microscaphidae, Cladorchiidae e Rhytidodiae), sendo a família do *R. uterocrescens*, uma dentre as descritas.

Apesar da menor frequência, nematoides podem parasitar tartarugas-verdes. Espécies como *Anisakis simplex*, *A. typica* e *Sulcascaris sulcata*, se alojam no estômago (BURKE; RODGERS, 1982).

Os agentes parasitários estão frequentemente associados a processos inflamatórios. Os principais parasitos relatados em enfermidades parasitárias em tartarugas- verdes, bem como as lesões de quais foram identificados são exibidos na tabela a seguir (TABELA 2).

Tabela 2 – Principais agentes parasitários associados a lesões em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) e seus respectivos processos patológicos, distribuídos por sistema.

Sistema/local	Processo patológico	Agentes parasitários associados
Cardiovascular	Endocardite mural necrosante	*Learedius learedi* (WERNECK et al., 2006).
	Vasculite granulomatosa + Aneurisma aórtico com trombo	*Hapalotrema postorchis* e *H. pambanensis* (SANTORO; MORALES; RODRÍGUES-ORTIZ, 2007).
	Endocardite focal	*Hapalotrema* sp. (SANTORO; MORALES; RODRÍGUES-ORTIZ, 2007).
Digestório	Esofagite ulcerativa caseosa	*Rameshwarotrema uterocrescens* (RIBEIRO et al., 2017; SANTORO et al., 2007). Parasitos das Famílias Pronocephalidae, Microscaphidae, Cladorchiidae e Rhytidodiae* (CALAIS JUNIOR, 2015).
	Gastrite	*Chroicocephalus* sp. e *Diaschistorchis* sp.
	Gastrite ulcerativa hemorrágica e serosite	*Anisakis simplex*, *A. typica* (BURKE; RODGERS, 1982; GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990).
	Gastrite aguda e crônica	*Porrocaecum sulcatum* (BURKE; RODGERS, 1982).
	Ulceras gástricas, gastrite crônica e/ou serosite	*Sulcascaris sulcata* (BURKE; RODGERS, 1982; GLAZEBROOK; CAMPBELL, 1990)
Urogenital	Cistite hiperplásica linfocítica	*Rhytidodoides similis* (WERNECK et al., 2015).

* Espécies não identificadas
+ Ocorrência em diversos órgãos do corpo
Fonte: Os autores.

2.1.4 Agentes fúngicos

Os répteis são mais resistentes às infecções fúngicas quando comparado a outros vertebrados. Geralmente as infecções estão relacionadas com alta umidade, má nutrição,

superlotação e falta de higiene. As infecções afetam principalmente tegumento, sistema respiratório e trato gastrointestinal, sendo comuns casos de infecções bacterianas e fúngicas mistas de organismos oportunistas (BAPTISTOTTE, 2014).

Mesmo incomum em tartarugas-verdes, as micoses também foram relatadas. As micoses sistêmicas ocorrem primariamente no pulmão com possível disseminação e formação de granulomas em fígado e cavidade celomática (CABANES et al., 1997). Jacobson et al. (1979) identificaram *Paecilomyces* sp. em pneumonia granulomatosa de *Chelonia mydas*, ao passo que Glazebrook e Campbell (1990) observaram lesões semelhantes com isolamento de *Paecilomyces* sp., *Fusarium scirpi* e *Penicillium* sp..

Donnelly et al. (2015) diagnosticaram feohifomicose (infecções oportunistas, cutâneas e sistêmicas, causadas por fungos demáceos) em três tartarugas-verdes juvenis. Os autores observaram traqueite granulomatosa obstrutiva e houve isolamento de *Veronaea botryosa* em todos os casos. No entanto, o sequenciamento genético e culturas também identificaram *Cladosporium* sp., *Ochroconis* sp. e *Cochliobolus* sp..

Enfermidades fúngicas também foram diagnosticadas em outras espécies de tartarugas marinhas, como nos estudos de Cabanes et al. (1997) que observaram *Fusarium solani* associado a hialohifomicose em *Caretta caretta* e Orós et al. (2004) que verificaram enterite necrótica por *Candida albicans* em um exemplar da mesma espécie.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com essa revisão de literatura relatam-se os principais agentes infecciosos diagnosticados *em Chelonia mydas* (vírus, bactérias, parasitos e fungos), bem como as lesões desencadeadas por esses microrganismos. A evidenciação destes dados é importante, pois contribui para melhor entendimento de doenças infecciosas nesses indivíduos, além de expor o impacto desses agentes na população de tartarugas-verdes.

4 REFERÊNCIAS

BAPTISTOTTE, C. Testudines marinhos (tartarugas marinhas). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 259-270.

BINOTI, E. et al. Helminthfauna of *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) in the south of Espírito Santo State in Brazil. **Helminthologia**, Polônia, v. 53, n. 2, p. 195-199, 2016.

BJORNDAL, K. A. Nutritional ecology of sea turtles. **Copeia**, Lawrence, v. 1985, n. 3, p. 736-751, 1985.

BURKE, J. B; RODGERS, L. J. Gastric ulceration associated with larval nematodes (*Anisakis*sp. type I) in pen reared green turtles (*Chelonia mydas*) from Torres Strait. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 18, n. 1, p. 41-46, 1982.

CABANES, F. J. et al. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Fusarium solani* in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta* L.). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 12, p. 3343-3345, 1997.

CALAIS JÚNIOR, A. **Caracterização histomorfológica e histoquímica de esôfagos de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) com e sem alterações no litoral do Espírito Santo**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2015.

DOMICIANO, I. G. et al. The green turtle *Chelonia mydas* as a marine and coastal environmental sentinels: anthropogenic activities and diseases. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 5, p. 3417-3434, 2017.

DONNELLY, K. et al. Phaeohyphomycosis resulting in an obstructive tracheitis in three green sea turtles *Chelonia mydas* stranded along the Florida coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, Berlim, v. 113, n. 3, p. 257-262, 2015.

GLAZEBROOK, J. S.; CAMPBELL, R. S. F. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. I. Farmed turtles. **Diseases of Aquatic Organisms**, Berlim, v. 9, n. 1, p. 83-95, 1990.

GLAZEBROOK, J. S.; CAMPBELL, R. S. F.; THOMAS, A. T. Studies on an ulcerative stomatitis-obstructive rhinitis-pneumonia disease complex in hatchling and juvenile sea turtles *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*. **Disease of Aquatic Organisms**, Berlim, v. 16, n. 1, p. 133-147, 1993.

GOMES, M. C. et al. Ecologia da comunidade de helmintos gastrointestinais de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) recolhidas no litoral do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 69, n. 3, p. 644-650, 2017.

HIRTH, H. F. **Synopsis of the biological data on the green turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758)**. Washington, D.C.: Fish and wildlife service U. S. Department of the interior, 1997.

IUCN - União Internacional para Conservação da Natureza. **Red list of threatened species**. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 15 fev. 2020.

JACOBSON, E. R. et al. Mycotic pneumonia in mariculture-reared green sea turtles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 175, n. 8, p. 929-933, 1979.

KLINGENBERG, R. J. **Understanding reptile parasites**. 2. ed. California: Advanced Vivarium Systems, 2007.

KNÖBL, T.; REICHE, R.; MENÃO, M. C. Fibropailomatose em tartarugas marinhas. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 6, n. 1, p. 64-69, 2011.

MATUSHIMA, E. R. et al. Cutaneous papillomas of green turtles: a morphological, ultra-structural and immunohistochemical study in Brazilian specimens. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 51-54, 2001.

MONEZI, T. A. et al. Chelonid herpesvirus 5 in secretions and tumor tissues from green turtles (*Chelonia mydas*) from southeastern Brazil: a ten-year study. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 186, n. 1, p. 150-156, 2016.

MONTALI, R. J. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). **Journal of Comparative Pathology**, Amsterdã, v. 99, p. 1-26, 1988.

ORÓS, J.; CALABUIG, P.; DÉNIZ, S. Digestive pathology of sea turtles stranded in the Canary Islands between 1993 and 2001.**The Veterinary Record**, Londres, v. 155, n. 6, p. 169-74, 2004.

ORÓS, J. et al. Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 63, n. 1, p. 13-24, 2005.

ORÓS, J. et al. Intestinal candidiasis in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*): an immunohistochemical study. **The Veterinary Journal**, Amsterdã, v. 167, n. 2, p. 202–207, 2004.

PRITCHARD, P. C. H.; MORTIMER, J. A. Taxonomy, external morphology, and species identification. In: ECKERT, K. L. et al. **Research and management techniques for the conservation of sea turtles**, Washington DC: Marine Turtle Specialist Group Publication, n. 4, 1999. p. 1-18. Disponível em: <https://www.widecast.org/Resources/Docs/Pritchard_and_Mortimer_1999_Sea_Turtle_Taxonomy.pdf>. Acesso em: 25 de jun. 2020.

PEIXOTO, L. J. S. et al. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 3, p. 453-461, 2012.

REIS, E. C. et al. Condição de saúde das tartarugas marinhas do litoral centro norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil: avaliação sobre a presença de agentes bacterianos, fibropapilomatose e interação com resíduos antropogênicos. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 756-765, 2010.

RIBEIRO, R. B. et al. Parasitic ulcerous caseous gastroesophagitis associated with *Rameshwarotrema uterocrescens* Rao, 1975 (Digenea: Pronocephalidae) in a juvenile green turtle [*Chelonia mydas*, Linnaeus 1758 (Testudines: Cheloniidae)]: a case report. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 103, n. 3, p. 292-294, 2017.

RODRIGUES, S. M. A. et al. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 5, p. 407-411, 2001.

ROMANINI, E. **Ecologia alimentar de tartarugas-verdes, *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758), em Ilhabela e Ubatuba – litoral norte de São Paulo, Brasil**. 2014. 60 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

SANTORO, M. et al. Aerobic bacterial flora of nesting green turtles (*Chelonia mydas*) from tortuguero national park, Costa Rica. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Florida, v. 37, n. 4, p. 549-552, 2006.

SANTORO, M.; MORALES, J. A. RODRÍGUES-ORTIZ, B. Spirorchiidiosis (Digenea: Spirorchiidae) and lesions associated with parasites in Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*). **The Veterinary Record**, Londres, v. 161, n. 1, p. 482-486, 2007.

SANTORO, M. et al. *Rameshwarotrema uterocrescens* trematode parasitism of the oesophageal glands in green sea turtles (*Chelonia mydas*). **The Veterinary Record**, Londres, v. 160, n. 2, p. 59-60, 2007.

SANTOS, A. S. et al. Plano de ação nacional para a conservação das tartarugas marinhas. In: MARCOVALDI, M. A. A. G. D.; SANTOS, A. S.; SALES, G. **Série espécies ameaçadas no 25**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), 2011. p. 21-57. Disponível em: <http://ibimm.org.br/wp-content/uploads/2017/05/plano-nacional-conserva%C3%A7%C3%A3o-tartarugas-marinhas.pdf>. Acesso em 16 de mar. de 2020.

TROIANO, J. C. **Doenças dos répteis**. São Paulo: Editora MedVet, 2018.

VEGA-MANRIQUEZ, D. X. et al. Identification of bacteria present in ulcerative stomatitis lesions of captive sea turtles *Chelonia mydas*. **Veterinary Research Communications**, Suíça, v. 42, n. 3, p. 251-254, 2018.

WERNECK, M. R. et al. *Learedius learedi* Price 1934 (Digenea, Spirorchiidae) in *Chelonia mydas* Linnaeus 1758 (Testudines, Chelonidae) in Brazil: case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 550-555, 2006.

WERNECK, M. R. **Estudo da helmintofauna de tartarugas marinhas procedentes da costa brasileira**. 2011. 147 f. Tese (Doutorado em Biologia de parasitas e microorganismos), Programa de Pós- Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

WERNECK, M. R. et al. Occurrence of *Rhytidodoides similis* Price, 1939 (Digenea, Rhytidodidae) and lesions due to Spirorchiid eggs in a green turtle, *Chelonia mydas* Linnaeus, 1758 (Testudines, Cheloniidae), from Brazil. **Comparative Parasitology**, Lawrence, v. 82, n. 2, p. 291- 295, 2015.

ZWARG, T. et al. Avaliação hematológica e histopatológica de tartarugas verdes de vida livre (*Chelonia mydas*) com e sem fribropapiloma do litoral norte de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 7, p. 682-688, 2014.

Alterações morfológicas em quelônios que ocorrem no Brasil e suas possíveis causas

Gabriela de Oliveira Resende[1]
Felipe Martins Pastor[2]
Luma de Oliveira Mulinari[3]
Maria Mauri Marques[4]
Venâncio Cardoso de Magalhães e Santos[5]
Maria Aparecida da Silva[6]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gabrielaoresende@hotmail.com
[2] Universidade Federal de Uberlândia, e-mail: felipempastor@gmail.com
[3] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: luma.mulinari@hotmail.com
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mmaurimarques@gmail.com
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, magalhaes.venancio93@gmail.com
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mvmariaaparecida@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Conhecidos popularmente como tartarugas, jabutis e cágados, os quelônios são animais que apresentam ossificação na região dorsal, denominada carapaça, com costelas fusionadas e placas ósseas na região ventral, denominada plastrão. Pertencentes a Ordem Testudines, apresentam 36 espécies distribuídas em todo o Brasil, esta ordem é dividida em duas subordens denominadas: Cryptodira (cripto: escondido; dire: pescoço) e Pleurodira (pleuro: lado; dire: pescoço) (FERRONATO et al., 2009).

Na subordem Cryptodira está inclusa a família Testudinidae, com destaque para as duas espécies de jabutis *Chelonoidis carbonarius* e *Chelonoidis denticulatus* endêmicas em território nacional. A família Emydidae, pertencente à ordem Chelonia, possui 85 espécies, da qual a maior parte é dulcícola tendo como destaque as espécies e subespécies de *Trachemys* sp. (CALDOGNETO; PUORTO; SERAPICOS, 2002; FERRONATO et al., 2009).

C. carbonarius e *C. denticulatus*, conhecidas respectivamente como jabuti-piranga e jabuti-tinga, exercem importante papel ecológico em seu habitat natural por contribuírem como dispersores de sementes e auxiliam na ciclagem de nutrientes ao se alimentarem de materiais detritívoros (BARROS et al., 2012). Conhecidas popularmente como Tigre d'água, *Trachemys* sp. possui três subespécies que são de relevância no cenário mundial devido à sua adoção como *pets*: *Trachemys scripta elegans*, *Trachemys scripta scripta* e *Trachemys dorbigni* (MARTINS et al., 2020).

Ressalta-se que o mercado de *pets* não convencionais teve impulsão na década de 70, o que ocasionou aquisição de quelônios por pessoas que desejavam ser tutores de tais animais, ocasionando a inserção de *Trachemys* sp. em todo o território nacional (FERRONATO et al., 2009).

No entanto, é importante salientar que a introdução de espécies exóticas em ambientes naturais, influência de forma negativa nas populações nativas, ocasionando problemas como: competitividade por recursos, território, predação, transmissões de patógenos e hibridação. A introdução destes indivíduos em ambientes naturais pode ocorrer por escape do ambiente onde vivem, relacionado ao mau manejo do local, ou, ainda, pela soltura de animais *pets* por seus proprietários que não sabem como manejar corretamente os indivíduos (MARTINS et al., 2020).

Embora a hibridação seja considerada um processo natural, o cruzamento entre espécies exóticas pode acarretar problemas reprodutivos, levando à extinção local de determinadas espécies animais. Compreender a amplitude de tal processo tem grande importância na

preservação e manejo adequado do ecossistema e dos indivíduos que ali se encontram (BARTON, 2001).

Portanto, os estudos comparativos da morfologia do animal constituem-se ferramenta adequada para identificar e investigar a possível diferenciação existente. Embora os estudos genéticos sejam mais eficientes em especificar a carga genética do indivíduo ainda é preciso padronizar os parâmetros para as análises criptogenéticas (SILVA, 2015).

Sendo assim, objetivou-se com este capítulo apresentar atualizações sobre algumas alterações morfológicas descritas na literatura em espécies de quelônios existentes no Brasil.

2 HIBRIDAÇÃO

A hibridação é o cruzamento entre indivíduos geneticamente diferentes, chamado interespecífico quando ocorre entre espécies distintas. É considerada um fenômeno relativamente raro em ambiente natural, mas amplamente utilizado em sistemas de cultivo animal (BARTLEY; RANA; IMMINK, 2001). Sendo considerado processo evolutivo, a hibridação natural possui relevância no método para adaptação e especiação de indivíduos (BARTON, 2001).

A fim de se criar linhagens mais vigorosas, cruzamentos intraespecíficos em laboratório geraram híbridos com características genéticas de interesse econômico para a piscicultura. O “tambacu’’ foi resultado da hibridação de duas espécies de origens distintas. Seu parentais foram o Tambaqui (*Colossoma macropomum*), endêmico da região das bacias amazônicas, e o Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), nativo da região da bacia Platina. Outra espécie híbrida criada foi o “Tabatinga’’, obtido a partir do cruzamento de indivíduo puro de Tambaqui (*C. macropomum*) com Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) (ALVES et al., 2014).

2.1 HIBRIDAÇÃO DE QUELÔNIOS EM AMBIENTE NATURAL

A invasão de espécies exóticas tem sido apontada como a principal ameaça à biodiversidade global, ocasionando mudanças nas populações locais. Sendo a hibridação de espécies nativas com exóticas apontada como impacto negativo, resultando, principalmente, em baixa aptidão reprodutiva. A adoção de quelônios como *pets* ocasionou consequências como soltura indevida ou fuga do ambiente onde viviam confinados, trazendo impacto negativo em estoques naturais de populações de quelônios (FERRONATO et al., 2009).

O fenômeno conhecido por especiação de espécies tem ocorrido nas populações de quelônios, uma vez que estão começando a se diferenciar morfologicamente. Na natureza, o conhecimento da população de vertebrados híbridos deixa lacunas no entendimento da especiação das espécies animais (MALLET, 2005). Estima-se que aproximadamente 10% da população de animais de ambiente natural participam de processos de hibridação, sendo a dinâmica organizacional relacionada de como a população se distribui geograficamente e de que maneira se dará o sucesso reprodutivo da espécie (BARTON, 2001; MALLET, 2005).

Recentemente populações de quelônios, tanto terrestres quanto aquáticos, vem sendo investigadas para a compreensão dos processos de hibridação que ocorrem no ambiente natural. Figueiredo (2014) utilizou de análises multivariadas (citogenética, perfil de hemoglobulina, filogenética e morfologia) para verificar a procedência de alterações morfológicas em três sub-gêneros de *Trachemys* sp. e observou a ocorrência de indivíduos com fenótipo e genótipos variados entre três espécies, ocorrendo, portanto, a hibridação. Enquanto Silva (2015) demonstrou dados não apresentados em literatura anteriormente sugerindo a existência de um morfotipo de *Chelonoidis* sp.

2.2.1 Alterações morfológicas em *Trachemys* sp.

O gênero *Trachemys* pertence à subfamília Emydinae, possui 10 subgêneros e 35 espécies, sendo três subgêneros de maior importância do ponto de vista ecológico por sua ampla introdução em territórios não nativos: *Trachemys scripta elegans*, *Trachemys scripta scripta* e *Trachemys dorbigni*. Naturalmente *T. scripta elegans* e *T. scripta scripta* ocorrem na América do Norte, mas foram introduzidas em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil, como *pet*s. Enquanto *T. dorbigni* é uma espécie encontrada naturalmente no Uruguai, Argentina e Brasil, endêmica à região Sul, mas foi introduzida em outros estados do território brasileiro. Há registro nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (COSTA; BÉRNILS, 2018; FERRONATO et al., 2009; RHODIN et al., 2017). Conhecida como tigre d'água de orelha vermelha ou tigre d'água americano, *T. scripta elegans* (FIGURA 1), nativa dos Estados Unidos é um exemplo de espécie que foi introduzida no Brasil por meio do mercado *pet*. Estes animais apresentam como características morfológicas de diferenciação da espécie, manchas pós-orbitais de coloração vermelha, plastrão amarelo com manchas irregulares arredondadas (ocelos) enegrecidos, dispostos à margem de cada escudo de maneira difusa. Nessa espécie há um dimorfismo sexual tendo a fêmea medidas de carapaça maiores que os machos (BUJES, 2010; FERRONATO et al., 2009; ROSSI; LOVATO; HOFLING, 2006).

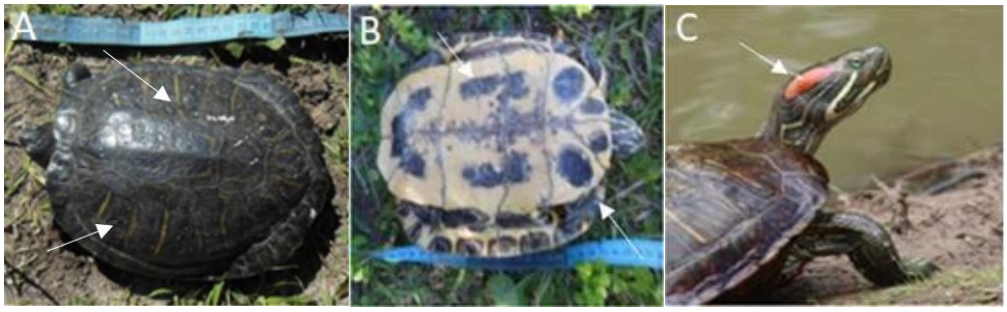

Figura 1 – Morfologia externa de *Trachemys scripta elegans*. A) Casco com linhas transversais amarelas (seta). B) Plastrão amarelo com manchas irregulares arredondadas nos escudos (ocelos) dispostas a margem das placas (seta). C) Crânio com linha pós-orbital de cor vermelha (seta).
Fonte: Adaptado de Figueiredo (2014).

O casco e o plastrão em quelônios tem relevância taxônomica, sendo importante na identificação de espécies. O casco de *T. dorbigni* possui contorno elíptico e alongado, levemente convexo composto por escudos divididos em: um nucal, dois supracaudais, vinte e dois marginais, cinco vertebrais e oito costais (FIGURA 2) (BUJES, 2008; BUJES, 2010). Souza, Malvasio e Lima (2000) descreveram os escudos córneos em *T. dorbigni* como revestimento sendo os vertebrais compostos por cincos em formato hexagonal dispostos crânio-caudalmente entre escudo nucal e supra-caudal. Seguido a série, dispostos em duas fileiras lateralmente aos escudos vertebrais se encontram os escudos costais compostas por oito grandes placas dispostas em duas carreiras, uma a esquerda e outra a direita. A terceira série de escudos córneos é denominada por marginal, compostas por 25 placas dispostas na margem de todo o casco. Alterações presentes nessas estruturas podem evidenciar possíveis modificações da espécie ou do indivíduo.

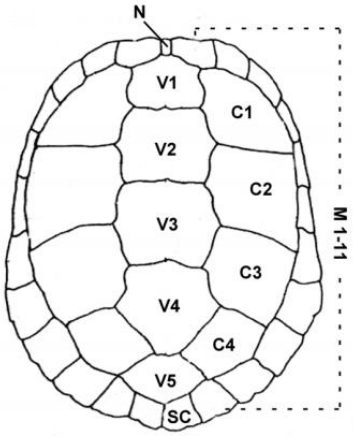

Figura 2 – Representação da vista dorsal dos escudos do casco de indivíduo padrão de *Trachemys dorbigni*. N = nucal (1), V = vertebral (V1-V5), C = costal (C1-C4), M = marginal (M1-M11) e SC = supracaudal (1).
Fonte: Bujes (2008).

Além do padrão do casco de *T. dorbigni* outras características possuem caracter taxonômico para identificação da espécie: o plastrão é amarelo com manchas enegrecidas nas regiões de suturas medial até os escudos inframarginais, dispostas de maneira difusa, a linha pós-orbital de coloração amarelada e casco com tons de verde oliva e detalhes em tons verdes mais claros nos escudos (FIGURA 3) (FIGUEIREDO, 2014).

Figura 3 – Morfologia externa de *Trachemys dorbigni.* A) Plastrão com manchas uniformes enegrecidas (seta). B) Crânio com mancha pós-orbital amarela (seta). C) Casco com tons de verde escuro a amarelo.
Fonte: Adaptado de Figueiredo (2014).

Conhecida popularmente como tartaruga-de-barriga-amarela, a espécie exótica *T. scripta scripta*, possui no casco faixas longitudinais amarelas nos escudos costais, o plastrão de coloração amarela com pontos enegrecidos dispostos amplamente e na região cranial há linha pós-orbital amarela (FIGURA 4) (FIGUEIREDO, 2014).

Figura 4 – Morfologia externa de *Trachemys scripta scripta*. A) Casco de tonalidade esverdeada com linhas longitudinais amarelas dispostas nos escudos costais (seta). B) Plastrão uniforme e amarelo apresentando pequenos pontos enegrecidos (seta). C) Crânio com linha pós-orbital amarela (seta).
Fonte: Adaptado de Figueiredo (2014).

Devido à proibição da comercialização de *T. s. elegans* em alguns países outras alternativas foram adotadas para atender ao público interessado na criação desses animais. E então deu-se início a criação e venda de *T. s. scripta* em criadouros legalizados, porém, o alto valor de venda fez com que a procura fosse baixa e possivelmente isso tenha levado a baixa ocorrência desta espécie em território brasileiro, o excluindo como potencial invasor

(FIGUEIREDO, 2014). Após a adoção dessas espécies como *pets*, o registro na natureza de indivíduos exóticos começou a ocorrer, devido a soltura indevida ou fuga do ambiente cativo (FERRONATO et al., 2009).

A fim de avaliar a possível ocorrência da hibridação em *Trachemys* sp., Figueiredo (2014) analisou 40 espécimes de criadouro particular e da Reserva Romonetto no Estado do Paraná, identificando seis indivíduos caracterizados morfologicamente como híbridos. Um dos indivíduos identificado como híbrido (FIGURA 5) apresentou morfologia em que os ocelos, característicos de *T. s. elegans*, ficaram evidentes na região de plastrão. Contudo, a posição dos ocelos nos escudos do plastrão se agrupou para a linha média, evidenciando característica observada em *T. dorbigni*. A linha pós-orbital alaranjada e o casco com linhas amarelas no escudo marginal epidérmico evidenciam características também descrita para *T. dorbigni*. Além dessas características as análises das linhagens por meio do DNA mitocondrial evidenciaram o cruzamento entre macho de *T. s. elegans* e fêmea de *T. dorbigni*. Estes dados revelam que há a possibilidade de cruzamento entre as subespécies de *Trachemys* sp. inclusive nos ambientes naturais (FIGUEIREDO, 2014).

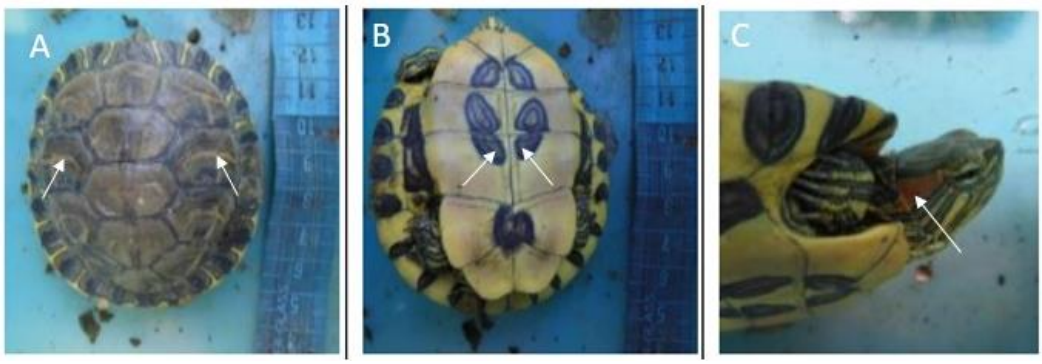

Figura 5 – Indivíduo identificado morfologicamente como híbrido. A) Casco com linhas amarelas transversais (seta), característica para *Trachemys scripta elegans*. B) Plastrão com ocelos em região medial (seta), formato dos ocelos característico em *Trachemys scripta elegans* e distribuição medial comum para *Trachemys dorbigni*. C) Crânio com linha pós-orbital alaranjada (seta), característica observada para indivíduos de *Trachemys dorbigni*.
Fonte: Adaptado de Figueiredo (2014).

Bujes (2008) analisou 51 indivíduos adultos de *T. dorbigni* e encontrou anomalias associadas ao casco desses indivíduos. As principais foram alterações nos escudos, que apresentaram maior largura em relação à padrão, algumas vezes com mais divisões do que o padrão estipulado para a espécie. Nos indivíduos adultos, fatores antrópicos como atropelamento, queimadas e ação de máquinas de lavouras foram apontadas como possíveis causas. O autor sugere que estas alterações estão relacionadas com estresses gerados durante o período de encubação no ninho. A variação da temperatura e o manuseio dos ovos durante o

período crítico do desenvolvimento embrionário são fatores que, associados, podem ocasionar anomalias no casco desses indivíduos.

As variações encontradas nos cascos de *T. dorbigni* foram apresentadas por Bujes (2008) e ilustradas na Figura 6. O primeiro indivíduo (FIGURA 6, A) apresentou 6 placas costais distribuídas ao longo da linha esquerda, sendo a terceira e a quarta divididas em duas. A quinta placa vertebral em maior tamanho, a terceira dividida em duas e a quarta placa em três. O exemplar descrito na Figura 6, B, por sua vez, apresentou placas em grande quantidade, sendo sete costais esquerdas distribuídas de formas variadas, com a primeira reduzida, a segunda, terceira e quarta divididas em duas. A quinta placa vertebral com aumento de tamanho em relação ao padrão apresentado pela espécie, além da segunda e terceira placas vertebrais com divisão longitudinal.

O indivíduo ilustrado na Figura 6, C, apresentou a quarta placa costal dividida em dois escudos, sem alterações nas demais. Por fim, o indivíduo esquematizado na Figura 6, D, apresentou o terceiro escudo costal modificado e ausência de tecido no sexto escudo marginal direito seguido de uma falha entre o oitavo e nono escudo.

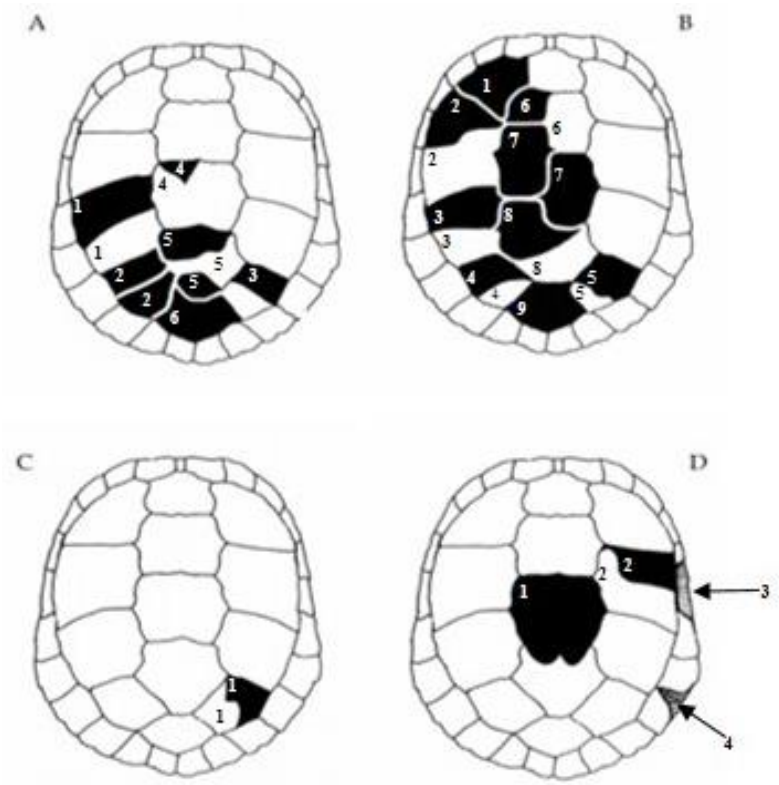

Figura 6 – Representação do casco de indivíduos *Trachemys dorbigni* com anomalias. A) Casco com terceira (1) e quarta (2) placa costal esquerda bipartidas; quarta placa costal direita dividida em duas (3); terceira placa vertebral com pequena repartição em duas (4); quarta placa vertebral dividida em três (5) e quinta placa vertebral com aumento de tamanho (6). B) Quatro placas dérmicas costais esquerdas sendo a primeira reduzida (1), a segunda (2), a terceira (3) e a quarta

(4) divididas em duas; quatro placas costais direitas, sendo a quarta dividida em duas (5); cinco placas vertebrais sendo a segunda (6) e a terceira (7) com divisão longitudinal dupla; a quarta placa com divisão diagonal (8) e quinta placa vertebral com aumento de tamanho em relação ao padrão (9). C) Quarta placa costal bipartida (1). D) Aumento de tamanho da terceira placa vertebral (1); segunda placa costal direita dividida em duas (2); ausência de tecido no sexto (3) e o oitavo escudo marginal (4).
Fonte: Bujes (2008).

Devido à sua boa adaptabilidade reprodutiva, ambiental e maior agressividade quando comparados as espécies nativas, a ascensão de espécies exóticas de *Trachemys* sp. é preocupante do ponto de vista ambiental. Uma vez que há a possibilidade de sucesso reprodutivo num ambiente propício e possível supressão de animais nativos devido a disputa por recursos, fêmeas e território associado à agressividade de alguns indivíduos de *Trachemys* sp. (FERRONATO et al., 2009).

2.2.2 Diferenciação morfológica de *Chelonoidis* sp.

A espécie *Chelonoidis carbonarius*, conhecida popularmente como jabuti-de-patas-vermelhas, recebe este nome devido à coloração vermelha das extremidades distais de seus membros. No entanto, em determinadas localidades do Brasil, há relatos de colorações de tonalidade alaranjada ou amarela nos membros de determinados animais (BARROS et al., 2012; SILVA, 2015). Além do padrão de coloração, observam-se diferenças nas escamas pré-frontais repartidas e pequenas. Estas características, distintas ao longo do território brasileiro, levam alguns autores a acreditarem na possibilidade de especiação devido ao ambiente (BARROS et al., 2012; SILVA, 2015).

Por sua vez, a espécie *Chelonoidis denticulatus*, conhecida popularmente como jabuti-tinga, possui coloração amarela em membros e cabeça. Além disso, tal espécie apresenta escudo gular que ultrapassa a borda do casco, sendo esta mais angulada em relação a *C. carbonaria.* A coloração é utilizada como principal caractere na diferenciação entre as espécies. Contudo, dados de indivíduos mantidos em regime fechado evidenciam que diferenças no plastrão, casco e comprimento cefálico podem diferir entre as duas espécies (BARROS et al., 2012; SILVA, 2015). A Figura 7 apresenta a morfologia dos escudos pré-frontais de *C. denticulatus* e *C. carbonarius.*

Figura 7 – Morfologia dos escudos pré-frontais de *Chelonoidis denticulatus* e *Chelonoidis carbonarius*. A) Crânio com escudo pré-frontal amarelo, bi-partido e alongado em *C. denticulatus*. B) Crânio de coloração avermelhada com escudo pré-frontal em *C. carbonarius*, menor e mais arredondado.
Fonte: Silva (2015).

Populações morfologicamente diferentes entre *C. denticulatus* e *C. carbonarius* são relatadas como possíveis híbridos intraespecíficos (FIGURA 8). Contudo, a prole gerada se difere em cor e padrão de escamas pré-frontais, reproduzindo entre si indivíduos que se assemelham aos pais, sugerindo que haja morfotipos bem definidos e não hibridação (SILVA, 2015).

Figura 8 – A) Indivíduo classificado como morfotipo 1, apresentando escamas pré-frontais bipartidas (seta) e coloração alaranjada. B) Indivíduo classificado como morfotipo 2, escamas pré-frontais com divisão não completa (seta) e coloração amarela.
Fonte: Adaptado de Silva (2015).

Observa-se dimorfismo sexual nas espécies de *Chelonoidis* sp., sendo que geralmente o macho apresenta tamanho corpóreo maior que a fêmea, com maior angulação na região do plastrão, característica relacionada à cópula. *C. carbonarius*, apresenta maior angulação em plastrão nos machos. Além disso, também apresentam escudo gular curto e alongado na região

proximal do plastrão, em região de carapaça o escudo inguinar fica próximo à região de saída de membros e se apresenta curto e côncavo. As aberturas para membros e cauda mais longas são atribuídas às características da espécie em habitar regiões com vegetações abertas e de se locomover por longas distâncias nos períodos de seca (BARROS et al., 2012). Embora a diferença morfológica entre indivíduos das espécies de *C. carbonarius* e *C. denticulatus* apresente eficiência para a diferenciação, é importante subsidiar com mais informações acerca das distintas características relatadas (BARROS et al., 2012).

No acasalamento das espécies de *Chelonoidis* sp. as fêmeas de jabuti podem copular com diversos machos durante a temporada reprodutiva. Além da vocalização outros sinais são levados em consideração durante o cortejo como sinais olfativos, visuais e táteis. Dessa forma, a ocorrência de indivíduos de morfologia com caracteres genéticos distintos copulando e gerando descendentes, poderiam ocasionar proles distintas das parentais e possivelmente diferenciação entre as espécies (SACCHI et al., 2003).

A literatura indica essas diferenças como sendo dois táxons distintos e colorações diferentes devido à localidade onde habitam, contudo, o estudo de Silva (2015) sugere que o morfotipo I seja nova espécie se diferenciando filogeneticamente de *C. carbonarius* (FIGURA 9, A) e *C. denticulatus* (FIGURA 9, B). No estudo, outras variáveis foram analisadas para verificar a autenticidade da espécie (citogenética, filogeografia e perfil de hemoglobulina). Ferramentas como a genética, principalmente, têm sido empregadas para entender a dinâmica de espécies com potencial invasor. Embora a dinâmica do híbrido seja diferenciar mais a genética que a morfologia (RHYMER; SIMBERLOFF, 1996), populações de quelônios estão começando a se diferenciar morfologicamente, fenômeno conhecido como especiação de espécies (MALLET, 2005).

Diante do exposto, os padrões de coloração, proporções morfológicas e dados biogeográficos atribuídos a *C. carbonarius* podem se mostrar insuficientes para a identificação da espécie a nível territorial. Uma vez que ainda não é claro a tendência desses animais se diferenciarem de uma região para a outra. Com base nas características morfológicas, Silva (2015) definiu dois morfotipos. O morfotipo 1, apresenta coloração alaranjada (FIGURA 9, C) e maior distribuição geográfica entre os grupos apresentados. E o morfotipo 2, de coloração amarela (FIGURA 9, D) que se limita aos estados do Norte e Nordeste. Contudo a pressão antrópica ocasiona redução das populações o que dificulta inferir sobre taxas populacionais. O estudo com marcadores genéticos aproximou o morfotipo 1 a espécie *C. carbonarius,* e indica que o morfotipo 2 pode ser uma nova espécie. O autor ressalta a importância de estudos contínuos para a verificação dessa possível nova espécie (SILVA, 2015).

Figura 9 – Morfologia externa de: A) *Chelonoidis carbonarius* crânio de coloração vermelha (seta); B) Indivíduo de *Chelonoidis denticulatus*; C) Crânio de morfotipo 1, com detalhe para a coloração vermelha (seta), característico de *C. carbonarius*. D) Morfotipo 2 com detalhe para a coloração amarela (seta) no crânio, característica para *C. denticulatus*.
Fonte: Silva (2015).

Entretanto, a caracterização morfológica utilizada para diferenciar as espécies de *Chelonoidis* sp. por meio da coloração, embora seja muito utilizada, não é precisa. As medidas da carapaça e análise do plastrão se mostram metodologia mais aconselhável para a diferenciação das espécies e quando possível estudos com marcadores genéticos são os mais efetivos (BARROS et al., 2012; SILVA, 2015).

O processo evolutivo de espécies nativas pode ser prejudicado com a inclusão de espécies exóticas. Este processo, em sua maioria antrópico, gera modificações no habitat, capaz de romper o isolamento reprodutivo em populações nativas que acabam copulando entre diferentes espécies (MALLET, 2005). A hibridação pode acontecer devido desproporção no número de fêmeas acarretando no encontro entre espécies diferentes e sobreposição de áreas de utilização, como os ninhos. Em répteis marinhos este mecanismo ainda não é bem elucidado, e não se sabe se a estratégia de hibridação dar-se-á pela supressão de determinadas espécies nos pontos de nidificação ou por mecanismo natural de especiação, como apontado por Kelez, Velez-Zuazo e Pacheco (2016).

No estudo, Kelez, Velez-Zuazo e Pacheco (2016) descreveram um indivíduo de tartaruga marinha com características morfológicas externas semelhantes a *Chelonia mydas*, como coloração verde em casco e pele, borda marginal do casco não serrilhada e par de escalas pré-frontais, quatro pós-orbitais e presença de crista mediana na mandíbula inferior. Além

disso, o mesmo indivíduo apresentou características de *Eretmochelys imbricata* como um par de garra em cada nadadeira e bico longo e pontudo (FIGURA 10). Além das características morfológicas apresentadas a avalição genética mostrou que a probabilidade da progenitora materna deste indivíduo ser *E. imbricata* foi de um intervalo de probabilidade de 93,22% a 99,57%.

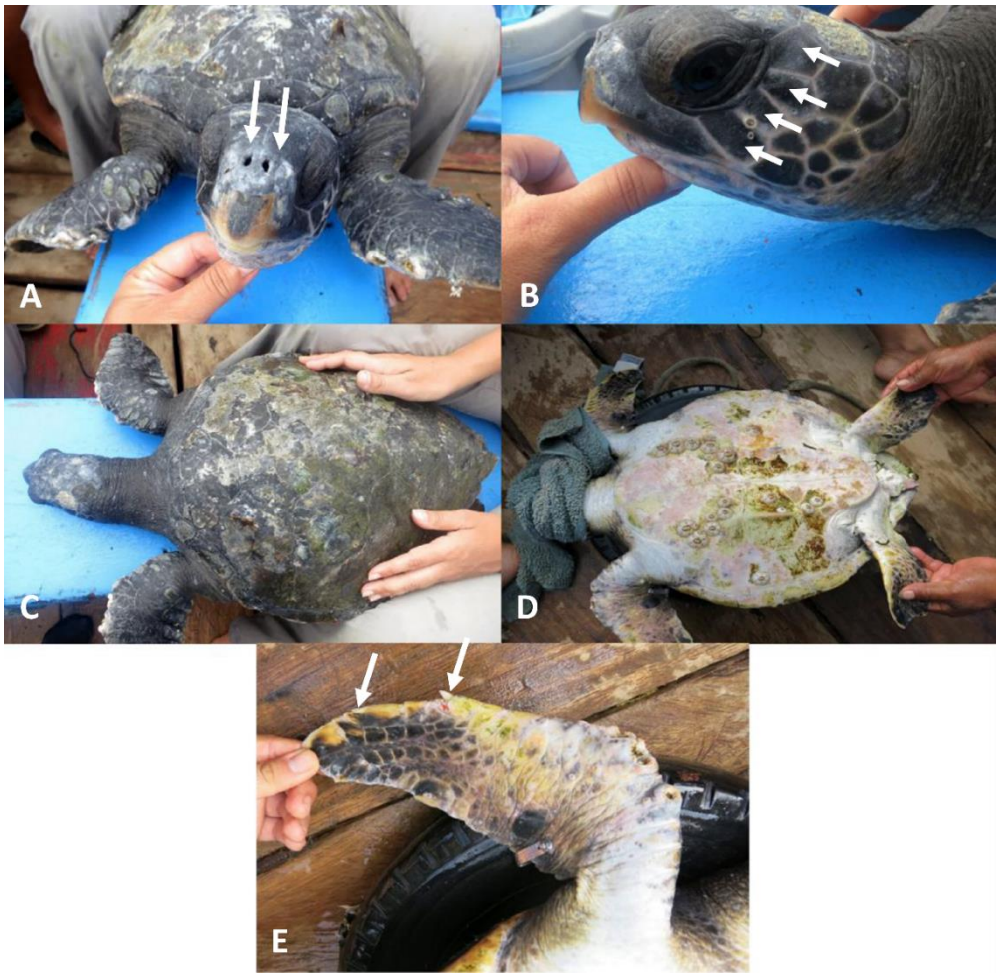

Figura 10 – Indivíduo híbrido de *Chelonia mydas* e *Eretmochelys imbricata*. Traços de *C. mydas*: (A) Par de escamas pré-frontais (seta). (B) Quatro escamas pós-orbitais(setas). (C) Coloração verde-escuro no casco e na pele. Traços de *E. imbricata:* (D) Plastrão rosado. (E) Dois pares de garras (setas).
Fonte: Kelez, Velez-Zuazo e Pacheco (2016).

No estado da Bahia 42% de indivíduos identificados morfologicamente como *E. imbricata* (tartaruga-de-pente) mostraram geneticamente hibridação entre *Caretta caretta* (tartaruga cabeçuda) e *E. imbricata*. Neste estudo os indivíduos foram avaliados férteis e em boa condição reprodutiva. A hibridação pode ocorrer, entre outros fatores, pela falta de disponibilidade de machos na região de nidificação (LARA-RUIZ et al., 2006).

Estudos com a viabilidade de indivíduos de quelônios marinhos são recentes, embora haja aumento populacional observado na última década, a incidência dos casos de indivíduos híbridos pode ser ainda maior. Fêmeas de quelônios marinhos copulam com mais de um parceiro e podem armazenar o material genético por longo período de tempo, sugerindo que a múltipla paternidade é comum nessas populações e que seus descendentes possuem fertilidade normal (SOARES et al., 2018).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no exposto, se observa que existem diversas alterações morfológicas nas espécies de quelônios no Brasil, sejam elas resultado de hibridação, ou apenas variação geográfica. Com isso, o conhecimento anatômico de táxons existentes se constitui como importante ferramenta no entendimento das funções, adaptações e possíveis modificações ao longo do processo evolutivo.

Conhecer a morfologia dos diferentes grupos animais traz o entendimento, que somado com estudos genéticos atuais, irão direcionar a ciência no conhecimento dos processos naturais e na elucidação dos impactos antropogênicos sobre as espécies.

4 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo auxílio financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

5 REFERÊNCIAS

ALVES, A. L. et al. **Riscos genéticos da produção de híbridos de peixes nativos.** 1. ed. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2014.

BARROS, M. S. et al. Morphological variations and sexual dimorphism in *Chelonoidis carbonaria* (Spix, 1824) and *Chelonoidis denticulata* (Linnaeus, 1766) (Testudinidae). **Brazilian Journal Biology**, São Carlos, v. 72, n. 1, p. 153-161, 2012.

BARTLEY, D. M.; RANA, K.; IMMINK, A. J. The use ofinter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Netherlands, v. 10, n. 3, p. 325-337, 2001.

BARTON, N. H. The role of hybridization in evolution. **Molecular Ecology**, London, v. 10, n. 3, p. 551-568, 2001.

BUJES, C. S. **Biologia e conservação de quelônios no Delta do Rio Jacuí – RS:** aspectos da história natural de espécies em ambientes alterados pelo homem. 2008. 248 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2008.

BUJES, C. S. Os Testudines continentais do Rio Grande do Sul, Brasil: taxonomia, história natural e conservação. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 100, n. 4, p. 413-424, 2010.

CALDOGNETO, L.; PUORTO, G.; SERAPICOS, E. O. Estudo dos valores glicêmicos em *Trachemys scripta elegans* mantidas em cativeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA. XXIV, 2002, Itajaí/SP. **Anais...** Itajaí: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2002. p. 448.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 11-57, 2018.

FERRONATO, B. O. et al. The turtle *Trachemys scripta elegans* (Testudines, Emydidae) as an invasive species in a polluted stream of southeastern Brazil. **Herpetological Bulletin**, London**,** v. 109, n. 109, p. 29-34, 2009.

FIGUEIREDO, P. I. C. C. **Verificação da ocorrência de hibridação entre tartaruga-tigre-d'água, *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) e tartaruga-americana, *Trachemys scripta* (Thunberg & Schoepff, 1762) (Testudines, Emydidae)**. 2014. 33 f. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Ciências Biológicas: Biologia Marinha e Costeira) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Osório/Imbé, 2014.

KELEZ, S.; VELEZ-ZUAZO, X.; PACHECO, A. S. First record of hybridization between green *Chelonia mydas* and hawksbill *Eretmochelys imbricata* sea turtles in the Southeast Pacific. **Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology**, San Diego, v. 4, p. 1-10, 2016.

LARA-RUIZ, P. et al. Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. **Conservation Genetics**, California, v. 7, n. 1, p. 773–781, 2006

MARTINS, G. A. et al. Estrutura populacional da *Trachemys scripta elegans* (tigre d'água da orelha vermelha) em um fragmento de Mata Atlântica em perímetro urbano na cidade de Maringá-Paraná. **Arquivos do Mudi**, Maringá, v. 24, n. 1, p. 68-81, 2020.

MALLET, J. Hybridization as an invasion of the genome. **Trends in Ecology & Evolution**, California, v. 20, n. 5, p. 229-237, 2005.

RHODIN, A. G. J. et al. **Turtles of the World**: annotated checklist and atlas of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. 8. ed. New York: Chelonian Research Foundation and Turtle Conservancy, 2017.

RHYMER, J. M.; SIMBERLOFF, D. Extinction by hybridization an introgression. **Annual Review**, Palo Alto, v. 27, p. 85 – 89, 1996.

ROSSI, S.; LOVATO, E.; HOFLING, J. C. Aspectos biológicos da tartaruga-de-orelha-vermelha, *Trachemys scripta elegans* (Reptilia, Testudines, Emydidae), em cativeiro. **Bioikos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 33-40, 2006.

SACCHI, R. et al. Vocalization and courtship intensity correlate with mounting success in marginated tortoises *Testudo marginata*. **Behaviour Ecology and Sociobiology**, Bonn, v. 55, n. 1, p. 95-102, 2003.

SILVA, T. L. **Análise morfológica e filogeográfica em jabutis brasileiros (Testudines)**. 2015. 186 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2015.

SOARES L. S. et al. Effects of hybridization on sea turtle fitness. **Conservation Genetics**, Netherlands, v. 19, p. 1311-1322, 2018.

SOUZA, A. M.; MALVASIO, A.; LIMA, L. A. B. Estudo do esqueleto de *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron) (Reptilia, Testudines, Emydidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 17, n. 4, p. 1041-1063, 2000.

Avanços no diagnóstico da tuberculose bovina

Ana Flávia Ferreira Selva[1]
Lhydyany Gonçalves Furtado de Melo[2]
Marcos Santos Zanini[3]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: aflavia44@hotmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lhydyanymelo@gmail.com
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: marcos.zanini@ufes.br

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa de interesse mundial, pois gera grande impacto na pecuária bovina, levando a prejuízos diretos e indiretos no sistema de produção (JORGE et al., 2004) e, de acordo com a OIE (*World Organization for Animal Health*) e com o art. 5º, do Decreto 5.741/2006 que regulamenta o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT, está entre as doenças de notificação compulsória (OIE, 2020; SILVA et al., 2014).

É uma doença infecto contagiosa causada por micobactérias, pertencentes a família *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium*, caracterizadas como bacilos Gram positivo, aeróbios, imóveis, não esporulados (SILVA; MOURA; REIS, 2011), não capsulados e não flagelados (PACHECO et al., 2009).

O *Mycobacterium bovis*, espécie causadora da tuberculose bovina, pode acometer várias espécies animais, ou seja, de exploração zootécnica, porém, tem maior incidência em bovinos e bubalinos. Trata-se de uma zoonose de evolução crônica e é caracterizada pela formação de lesões nodulares que acometem qualquer tecido ou órgão do corpo (MAPA, 2017). Sua maior prevalência se dá em países em desenvolvimento, pois apresentam conhecimentos limitados sobre a doença e planos para erradicação (MAPA, 2017). Em locais com regimes extensivos, a frequência da doença é bem menor quando comparada a países que adotam sistema de confinamento no inverno, ou, utilizam o confinamento como manejo de produção (SILVA; MOURA; REIS, 2011).

De acordo com Alzamora Filho et al. (2014), o Brasil é endêmico para tuberculose bovina, afetando principalmente as propriedades com sistema intensivo de criação de vacas leiteiras. Em parte, isto ocorre devido à alta demanda metabólica, característica dos animais lactantes e ao confinamento, promovendo maior contato entre os animais, favorecendo a disseminação da doença no rebanho. Com a finalidade de minimizar a prevalência e a incidência da doença nos rebanhos brasileiros, em 2001, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, estabeleceu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT) (JORGE et al., 2004).

O presente Capitulo de Livro tem como objetivos principais: abordar a tuberculose bovina em seus aspectos gerais e as técnicas de diagnósticos consagrados e inovadores, com ênfase em novas técnicas sorológicas, e, de genotipagem para detecção do *Mycobacterium* spp., que utilizam recursos de processos inovadores, contribuindo para a evolução do diagnóstico da tuberculose bovina.

2 ETIOLOGIA

De acordo com o MAPA (2017) as micobactérias causadoras da tuberculose pertencem a família *Mycobacteriaceae*, e, ao gênero *Mycobacterium*, que contempla 71 espécies. São bactérias bastonetes curtos, não capsulados, não flagelados e aeróbicos. Tem como característica a álcool-ácido resistência, apresentam aspecto granular corados em lâmina, e podem medir de 0,5 a 0,7 μm de comprimento e 0,3 μm de largura. O gênero *Mycobacterium* compreende aos patógenos: oportunistas, obrigatórios, e aos saprofíticos (SILVA; MOURA; REIS, 2011).

A espécie *Mycobacterium bovis* é a causadora da tuberculose, que acomete principalmente bovinos e bubalinos, além de ser zoonose, causando tuberculose zoonótica em humanos (SILVA et al., 2014). Ela apresenta alta patogenicidade e crescimento lento, com cerca de 28 dias. *M. bovis* pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que é constituído por quatro espécies, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. microti* e *M. africanum*. (JORGE et al., 2004), além de acometer os bovinos, pode acometer outras espécies de animais como cães, gatos, carneiros, porcos, cavalos, e alguns pássaros, como papagaios, participa também da etiologia em humanos (SILVA; MOURA; REIS, 2011).

M. tuberculosis é a principal causadora de tuberculose em humanos, porém, pode acometer bovinos e sensibilizá-los ao teste de tuberculina. Outra microbactéria importante é *M. avium*, pertencente ao complexo MAIS, infecta principalmente aves. Em bovinos não é patogênica, porém, dificulta o diagnóstico quando submetido ao teste de tuberculina (MAPA, 2017).

3 DIAGNÓSTICOS CONSAGRADOS

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser feito através de dois métodos, direto e indireto. O método direto envolve detecção e identificação do agente etiológico no material biológico, ao passo que o método indireto pesquisa uma resposta imune do hospedeiro frente ao agente causador da doença. Essa resposta pode ser humoral, em que se encontra a produção de anticorpo circulante, como também pode ser celular, que é medida por linfócitos e macrófagos (PACHECO et al., 2009).

A tuberculose bovina é uma doença infectocontagiosa que possui grande variabilidade de sintomas e lesões, ou seja, possui sinais clínicos muito inespecíficos e pouco frequentes,

assim o exame clínico possui valor bastante relativo, permitindo apenas diagnóstico presuntivo (SILVA; MOURA; REIS, 2011).

O método mais confiável para o diagnóstico das doenças causadas por bactérias é o isolamento e identificação do agente. Porém, é pouco viável para uso rotineiro no diagnóstico da tuberculose bovina, devido à dificuldade de obter a amostra e a demora no crescimento do patógeno. Desta forma os métodos indiretos são os mais utilizados para o controle da enfermidade (JORGE et al., 2004).

O teste de tuberculina é feito de forma intradérmica sendo o método padrão utilizado em diversos países, porém cada local estabelece seu protocolo e interpretação baseado nas circunstâncias locais. Esse teste intradérmico não é 100% específico, podendo gerar falso positivos levando ao abate animais não infectados. Existem hoje, vários métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina acompanhados sempre do diagnóstico clínico, tais como o ensaio de interferon-gama (IFN-g) e testes sorológicos como o de ELISA. Alguns exames podem ser realizados *post-mortem* como o exame microscópico da lesão, anatomopatológico e o isolamento em cultivo. Apesar de existir diversos métodos de diagnosticar a tuberculose nenhum deve ser utilizado isoladamente (SOUZA et al., 2016). O teste de tuberculina é a forma tradicional de diagnosticar tuberculose bovina no animal ainda em vida, onde é inoculado de forma intradérmica a tuberculina, procedimento chamado de tuberculinização (CORREA; GARCIA, 2001). A tuberculina é um extrato retirado de filtrados de cultivo de *Mycobacterium* sp, esterilizado por fonte de calor, e quando inoculada no animal causa reação de hipersensibilidade retardada (MAPA, 2017).

A tuberculina utilizada ou PPD bovino (*purified protein derivative*) é uma proteína produzida a partir de culturas de amostras de *M. bovis*, possui a forma líquida incolor, diferente do PPD aviário utilizado para o teste comparativo, que possui forma líquida de coloração vermelho claro. Quando inoculado no animal de forma intradérmica, a resposta mediada por linfócitos T que irão migrar para o sítio de inoculação e reconhecem o peptídeo apresentado em conjunto com o complexo de histocompatibilidade principal bovina (BoLA) de Classe II na superfície celular de macrófagos. Então os linfócitos T liberam citocinas que agem sobre o endotélio vascular, recrutando outras células do sistema imune para o sítio de deposição do antígeno com mais recrutamento de linfócitos Th1, fagócitos, fluídos e proteínas produzindo edema e lesão (MAPA, 2017; SOUZA FILHO, 2013).

O teste de tuberculina vem sendo utilizado para diagnosticar tuberculose a mais de 100 anos em humanos (teste de Mantoux) e bovinos, quando efetuado de forma correta avalia a resposta do animal frente a tuberculina inoculada intradérmica por reação de hipersensibilidade

tardia com reação inflamatória (JORGE et al., 2004). Macroscopicamente a resposta imunológica do hospedeiro, é observada em forma de edema e endurecimento progressivo no local, esse edema atinge seu máximo com aproximadamente 48 a 72 horas pós inoculação, após a lesão atingir seu máximo segue-se com regressão do processo inflamatório (PAOLI, 2013). De acordo com o MAPA (2017) esse método possui três modalidades: prega caudal, cervical simples e cervical comparativo: prega caudal é o mais simples e prático, sendo ele utilizado na rotina, principalmente em locais que trabalham com bovinos de corte; cervical simples possui sensibilidade maior, é utiliza apenas a tuberculina bovina (PPD bovino); cervical comparativo serve para eliminar falso positivo, utilizando tuberculina bovina (PPD bovino) e a aviária (PPD aviário) simultaneamente.

Outra modalidade de diagnóstico consagrado é a observação de lesões histopatológicas características, apresentam necrose caseosa ao centro, podendo estar mineralizada, circulada por células gigantes tipo Langerhans, células epitelioides e na circunferência células mononucleares, linfócitos e raramente plasmócitos, circundados por tecido conjuntivo fibroso (PAOLI, 2013). Nos órgãos que apresentarem lesões com essas características, deve ser realizado a coleta de fragmentos da lesão, com espessura de até 1,5 cm, coletando a área lesionada e a área de aparência normal, o fragmento deve ser colocado em frascos contendo formol 10% com volume de 10 a 20 vezes maior que o tamanho do material (JORGE et al., 2004).

A amostra pode ser avaliada pela coloração de Ziehl-Neelsen juntamente com a microscopia óptica ou através da coloração com auramina O e microscopia de fluorescência, podendo assim detectar a micobactéria (RAMOS; SILVA; DELLAGOSTIN, 2015). O método histopatológico é um diagnóstico presuntivo, pois ele detecta o granuloma e estruturas bacilares. Em regiões de prevalência elevada da doença pode ser satisfatório para o diagnóstico, porém apresenta outros microrganismos bacilares como diagnóstico diferencial (JORGE et al., 2004).

4 TÉCNICAS INOVADORAS PARA DIAGNÓSTICO DE *Mycobacterium* spp.

4.1 GENOTIPAGEM

4.1.1 Reação em cadeia da polimerase – PCR

Esta técnica baseia-se na amplificação de segmentos específicos de ácidos nucleicos do microrganismo estudado por ação de uma polimerase resistente a temperaturas de 95 graus. Segundo Souza Filho (2013) as técnicas moleculares, particularmente a PCR, já tem sido usada dentro PNCEBT de forma complementar ao exame bacteriológico, devido algumas dificuldades encontradas no exame alérgico-cutâneo, como sua sensibilidade e ainda, o longo período para confirmação do exame bacteriológico de rotina. O sucesso deste método de diagnóstico depende de alguns fatores, como a disponibilidade de DNA micobacteriano livre de contaminantes, pois eles intervêm na amplificação, como também na escolha dos iniciadores (primers) e no emprego de métodos de extração adequados (PAOLI, 2013).

Na PCR a síntese enzimática repetida de fragmentos específicos do ácido desoxirribonucleico do microrganismo ocorre a partir de iniciadores compostos de oligonucleotídeos de sequências curtas, que localizam a parcela que corresponde na sequência do DNA do microrganismo. E com auxílio da polimerase passam a gerar cópias de forma exponencial, esse procedimento ocorre em reação cíclica, envolvendo três etapas, sendo elas: desnaturação térmica da dupla fita de DNA bacteriano, anelamento das fitas com o par de oligonucleotídeos iniciadores e extensão destes com o auxílio da enzima polimerase (JORGE et al., 2004).

De acordo com Zanini et al. (2001), a técnica de PCR apresenta sucesso para detectar membros do complexo *M. tuberculosis*, podendo fornecer diagnóstico rápido e útil para *M. bovis* em amostras de tecidos de bovinos infectados. Essa técnica mostrou maior rapidez e eficácia maior (11,4%) que o exame bacteriológico (0,4%) e o exame microscópico, utilizando como controle a cultura da micobactéria do tecido.

4.1.2 PCR multiplex

Na PCR multiplex utiliza-se mais de um primer em uma única reação, capazes de amplificar diferentes segmentos genômicos, gerando fragmentos de tamanho e peso molecular variados. Primeiramente é feita a extração do DNA, em um mesmo tubo são adicionados os diferentes

primers que amplificam sequências distintas, o teste segue como na PCR convencional por meio da eletroforese, onde os fragmentos são identificados com base em seu peso molecular já conhecido e padronizado em gel. A PCR multiplex é utilizada para a detecção simultânea de múltiplos agentes, principalmente quando estes podem causar síndromes clínicas idênticas ou similares, pesquisa de diferentes cepas de um mesmo microrganismo, investigar mais de uma sequência de um mesmo gene, detecção de doenças ocasionadas pela deleção ou inserção de um mesmo gene em diferentes regiões, e, em outras áreas de genéticas molecular. A capacidade de identificar múltiplos agentes reduz o tempo e o custo do diagnóstico, mas alguns cuidados precisam ser tomados para a realização do teste, os primers devem apresentar temperatura de anelamento semelhante e não podem ter sequencias complementares (ALMEIDA, 2020).

4.1.3 PCR qualitativo em tempo real (qPCR)

A técnica de qPCR é realizada semelhante ao PCR convencional, possuindo as três fases de desnaturação, anelamento e extensão. Diferencia-se na capacidade em quantificar o microrganismos na amostra e está requer marcadores fluorescentes adicionados aos primers, ou seja, o qPCR é uma ferramenta de análise usada para aferir o nível de expressão de um DNA alvo, sua sequência ou a sequência de nucleotídeos de um gene (THORNTON; BASU, 2015). Quando se adiciona a sonda fluorescente, ela interage com uma sequência de nucleotídeos e reconhece partes especificas no DNA alvo, emitindo assim, sinal fluorescente correspondente ao ciclo de amplificação onde o DNA alvo é replicado (NEVES, 2016; THORNTON; BASU, 2015).

A PCR em tempo real revolucionou a abordagem para a quantificação de RNA e DNA pela PCR. A quantificação do material genético é monitorada ao decorrer dos ciclos de amplificação a partir da detecção do alvo amplificado. Assim, quanto maior for o número inicial de material genético alvo amplificado, mais rapidamente é observado aumento da fluorescência. Para que ocorra essa emissão da fluorescência, a molécula fluorescente absorve energia de uma fonte de luz, processa essa energia internamente estimulando suas moléculas, liberando em forma de luz, o tamanho da onda é captado e analisado por um software, registrado em formas de curvas de amplificação e de fluorescência e convertido na forma de *cycle threshold* (CT), que representa o número exato do ciclo. Durante o processo de amplificação, a emissão dos compostos fluorescentes provoca um sinal que aumenta de acordo com o aumento da quantidade de DNA clonado. Assim conforme a velocidade que o sinal atinge o CT, correlaciona-se com a quantidade da sequência alvo, permitindo então a quantificação do DNA

antes da amplificação (NEVES, 2016). Existem dois sistemas para detecção de sequencias: sistema TaqMan ® e sistema SYBR Green I (NOVAIS; ALVES, 2004).

4.1.4 *Spoligotyping* (espoligotipagem)

Técnica capaz de amplificar um único lócus altamente polimórfico no genoma da bactéria, apresenta múltiplas repetições diretas de 36 pb disposto intercalado com sequências espaçadoras não repetitivas de 34-41 pb. Também conhecido como DNA satélite são sequências curtas, simples e altamente repetitivas, se dispõe lado a lado (tandem), diferenciam do restante do DNA devido sua composição de base podendo se diferenciar também quanto ao gradiente de densidade (GONÇALVES, 2017).

A amplificação da amostra é feita por PCR, então ocorre hibridação em membrana com oligonucleotídeos previamente ligados de forma covalente (são específicos para cada uma das diferentes sequências espaçadoras). A espologotipagem detecta essas regiões DR por meio da hibridização reversa, assim, os resultados são analisados com base na hibridação ou não de cada sequência espaçadora formando um padrão de hibridação em cada amostra, o padrão individual é comparado entre as amostras (SINGH et al., 2004).

O teste é de rápida execução e permite realizar a tipificação das cepas, distingue especificidades geográficas, porém a espoligotipagem detecta apenas um locus (DR), por isso deve ser associado a outros métodos moleculares (GONÇALVES, 2017).

4.1.5 Sequenciamento do genoma completo

O sequenciamento do genoma completo busca definir a ordem das bases nitrogenadas nos ácidos nucleicos (DNA/RNA) para entender sua expressão no metabolismo das estruturas orgânicas avaliadas. Essa técnica teve seu início na década de 70 do século passado, quando para realizar o sequenciamento era necessário fragmentar o ácido nucleico. Para tanto, iniciou-se com as tecnologias desenvolvidas por Alan Maxam e Walter Gilbert baseada em hidrólise química dos ácidos nucleicos e outra tecnologia do grupo liderado por Frederick Sanger baseada em reações enzimáticas e marcação radioativa de nucleotídeos incorporados. Atualmente, estão em uso equipamentos diversos de sequenciamento para sequências mais longas de ácidos nucleicos que realizam o chamado “sequenciamento de nova geração” (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*). Sendo estes equipamentos com diferentes tecnologias classificados

como de segunda, terceira e quarta geração otimizando em rapidez e eficiência o processo de sequenciamento (FIETTO; MACIEL, [2020])

Essa técnica permite a detecção de diferenças na diversidade genética, que contribui para a investigações da epidemiologia da tuberculose e paridade entre genomas, de tal forma que foi determinado que o genoma do *Mycobacterium bovis* é 99,95% idêntico em sequência de nucleotídeos ao genoma do *Mycobacterium tuberculosis* (GHEBREMARIAM et al., 2018). Sendo este uma das principais razões para ambos pertencerem ao denominado Complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

4.2 TÉCNICAS SOROLÓGICAS

4.2.1 Imunocromatografia de fluxo lateral

Os testes rápidos imunocromatrográficos qualitativos tem encontrado muitas aplicações no diagnóstico sorológico das doenças infecciosas na medicina veterinária (babesiose, erliquiose, leishmaniose, doença de Lyme, anaplasmose...) e medicina humana (coronavírus, retrovírus, dengue...). Entre as formas de apresentação dos testes rápidos imunocromatrográficos para tuberculose, Ashford et al. (2020) utilizam o sistema imunocromatográfico de fluxo lateral (DPP - *dual path platform*) para diagnóstico da tuberculose em texugos (*Meles meles*), que atuam como reservatório de *M. bovis* no Reino Unido.

Modelos diversos existem no mercado, e o teste pode ser pensado e construído de acordo com o interesse particular da pesquisa. Os mais usados são o modelo sanduíche, indireto e multiplex. Entre estes destaca-se o modelo indireto, que detecta anticorpos alvos na amostra sanguínea. Os testes rápidos imunocromatográficos são compostos por: filtro da amostra, suporte do conjugado, membrana de nitrocelulose e filtro de adsorção, além das áreas de linhas de teste e controle (FIGURA 1) (JAPOLLA et al., 2015).

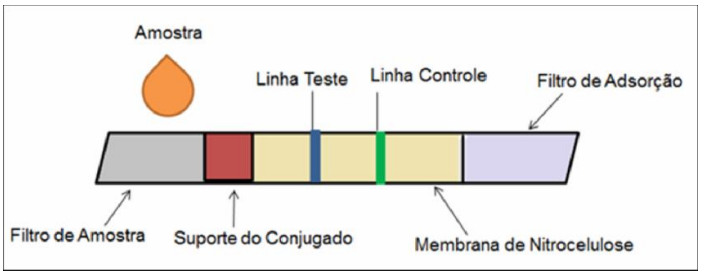

Figura 1 – Componentes do teste imunocromatográfico de fluxo lateral.
Fonte: Japolla et al. (2015).

A amostra sanguínea é depositada no poço A, em seguida é adiciona uma solução tampão, o filtro da amostra promove a distribuição uniforme e controlada do material, que segue para o suporte do conjugado, onde estão fixados antígenos específicos do microrganismo alvo, conjugados a nanopartículas de ouro coloidal. A amostra segue lateralmente por capilaridade pela membrana de celulose localizada na região analítica, onde se encontram as linhas de teste e controle, a capilaridade da membrana interfere na especificidade do teste. Na linha de teste estão fixados anticorpos anti-espécie, enquanto na linha de controle estão fixados anticorpos anti-antígeno. Quando uma amostra é adicionada ao poço, ocorre o escoamento lateral da amostra, a primeira interação ocorre no suporte de conjugados, seguindo para a linha de teste, e caso haja inteiração ocorre uma reação colorimétrica. Seguindo para a linha de controle, nesta, deve sempre ocorrer a interação com reação de cor, caso não ocorra a reação na linha controle o teste é invalidado. O filtro absorvente, garante que o fluxo da amostra ocorra de forma unilateral, impedindo que o material volte, evitando falso positivos (JAPOLLA et al., 2015).

4.2.2 Teste LAMP digital

A amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP; *loop-mediated isothermal amplification*) é uma variação da PCR convencional. Foi projetada usando a polimerase *Bst*, que é uma polimerase com atividade para amplificar o DNA ou o RNA alvo, uma vez que foi convertido em DNA por uma etapa de transcriptase reversa. Utilizando primers especialmente projetados, a polimerase produz produtos com estruturas em alça (*loop*). Não há necessidade de aumentar ou diminuir a temperatura como na PCR convencional porque a polimerase *Bst* é capaz de funcionar a uma temperatura única com alta sensibilidade (TAO et al., 2020).

A técnica emprega de quatro a seis primers e a enzima *Bst* DNA polimerase além da atividade de síntese, atua abrindo a fita dupla de DNA. Uma DNA polimerase inicia a síntese da fita complementar e dois dos primers formam estruturas de alça para facilitar os ciclos subsequentes de amplificação. O resultado da amplificação é visualizado no próprio tubo a olho nu, graças ao pirofosfato de magnésio produzido durante a reação. O LAMP é uma técnica recente e inovadora que surgiu como ferramenta simples e rápida de amplificação de DNA que pode ser utilizada para detecção e identificação de diversos patógenos a campo. Se mostra uma alternativa na detecção do *M. bovis* no leite (TAO et al., 2020).

Os protocolos de amplificação isotérmica são diversos e têm vantagens variadas. Algumas dessas vantagens são reações extremamente rápidas e a não utilização de termocicladores (NUNES, 2013).

4.2.3 Western blot

Essa técnica é uma evolução de outras duas técnicas, o Southen blot, utilizado para a detecção de DNA, e o Northern blot, para detecção de RNA. O Western blot por sua vez, atua na detecção de proteínas, por meio da utilização de anticorpos. É uma técnica altamente específica, em contrapartida apresenta alto custo. A grande importância desta técnica é permitir a avaliação de proteínas efetivamente antigênicas em um patógeno (KASHI et al., 2020).

Uma aplicação da técnica na Medicina Veterinária é um desdobramento do estudo do PPD (derivado de proteína purificada). O PPD é obtido através de filtrados de cultura aquecida de microbactérias sendo o antígeno tradicionalmente utilizado no diagnóstico de tuberculose bovina e em investigações imunológicas. Porém este teste envolve imunidade de anticorpos policlonais que são menos sensíveis, sendo assim essencial o desenvolvimento de reagentes mais específicos. Foram investigadas, isoladas, clonadas e purificadas várias proteínas da microbactéria mais específicas que fazem parte do PPD, entre elas as proteínas de baixo peso molecular, principalmente as ESAT-6 e CFP-10, que são extremamente imunogênicas e possui potencial de aumentar a sensibilidade do diagnóstico. A avaliação da presença de anticorpos para estas proteínas tem utilizado a técnica denominada western blot que se constitui em uma cromatografia de troca iônica para separação dessas proteínas dos filtrados (KASHI et al., 2020).

O teste é dividido em basicamente cinco (5) etapas: extração, fracionamento, transferência de proteína, bloqueio e detecção (MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO; 2012).

A extração compreende a obtenção da amostra de proteínas para a realização do teste. Pode ser feito o cultivo do microrganismo para posterior fracionamento e obtenção da amostra. A extração pode ser mecânica ou por meio de sonicação (lise do microrganismo através de ondas sonoras), após obtenção da amostra ela é aquecida para que haja a desnaturação das proteínas (MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO; 2012).

Afim de realizar o fracionamento das proteínas da amostra corre-se em um gel submetido a uma carga elétrica, sendo o gel mais utilizado o dodecil sulfato de sódio poliacrilamida gel (SDS-PAGE). O SDS é um detergente aniônico, atua liberando íons negativos fazendo com que as proteínas ganhem carga elétrica negativa. Com a carga das proteínas negativa, elas se atraem para o polo positivo, por meio de uma voltagem que faz a migração das proteínas do polo negativo para positivo. O PAGE funciona como uma peneira, retendo gradativamente as proteínas maiores e permitindo um fluxo maior pelo gel das proteínas menores (MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO; 2012).

Após isto as proteínas divididas no gel são transferidas para uma membrana, normalmente de nitrocelulose ou PVDV (Polivinilideno de fluoreto). Pode ocorrer a transferência por capilaridade, onde as proteínas do gel sobem para a membrana devido a tensão superficial ou pela transferência eletroforética, onde os componentes são embebecidos com solução tampão e encaminhados para um equipamento, onde o gel fica posicionado mais perto do polo negativo e a membrana mais perto do polo positivo. É aplicada uma voltagem e as proteínas do gel migram para a membrana, seguindo um fluxo do polo negativo para o positivo. Para visualizar se a transferência, foi realizada com sucesso banha-se a membrana no corante Ponceau S que irá corar as bandas de proteínas (MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO; 2012).

Também deve ser feito o bloqueio da parcela não reagente da membrana que é realizado por meio de proteínas bloqueadoras, como a albumina bovina, que, são adicionadas e ocupam os espaços entre as proteínas, evitando que os anticorpos secundários se liguem nesses espaços, reduzindo resultados falso positivos (MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO; 2012).

A seguir o soro do paciente é adicionado e incubado por 12 horas para que ocorra a ligação do anticorpo específico do soro do paciente com o antígeno específico, após é adicionado o anticorpo secundário marcado por quimiluminescência ou fluorescência. Para a quimiluminescência, utiliza-se a enzima peroxidase ou fosfatase, e se houver a ligação do anticorpo primário ao antígeno, posteriormente ele se ligará ao anticorpo secundário, que será revelado pela adição do substrato para a enzima. Nos casos em que se utiliza fluorescência, o anticorpo secundário é marcado com um fluoróforo que ao ser exposto a um feixe laser emite fluorescência. Como controle para avaliação das parcelas da proteína estudada deve-se ter proteínas que apresentam comportamento conhecido de peso molecular no gel, que servirão de referência de peso molecular para os fragmentos obtidos com a fragmentação da proteína estudada. (MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO; 2012).

4.2.4 Biomarcadores celulares - interferon gama

Os biomarcadores são indicadores de um processo fisiológico, patogênico ou até mesmo resposta a uma intervenção terapêutica. Eles são utilizados como métodos de diagnóstico, prognóstico ou para monitorar respostas a uma intervenção. A tuberculose bovina possui como um exemplo o teste para o biomarcador interferon-gama ou INF-γ (IGRA; *interferon-gamma release assay*). Porém, além do INF-γ existe outros biomarcadores celulares que podem atuar no diagnóstico da tuberculose bovina, sendo eles: inteleucina-2, interleucina-1B, interleucona-

22, interleucina-21, interleucina-13, citocinas e quimosinas como CXCL9 E CXCL10 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) (PALMER et al., 2020).

O teste IGRA (i*nterferon gamma release assay*) tem como princípio a medida dos níveis *in vitro* do INF-γ produzido por células T que tenham sido estimuladas por antígenos de TB específicos purificados ou sintetizados. Estes antígenos são geralmente as proteínas ESAT-6, CFP-10, e TB7.7 que estão ausentes nas estirpes de BCG e na maioria das micobactérias não tuberculosas, com a exceção de *M. kansasii, M. szulgai,* e *M. marinum* (PALMER et al., 2020).

O protocolo do teste IGRA geralmente consiste em adicionar o sangue do paciente em tubo contendo estes peptídeos específicos para o Complexo *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7) sendo então incubados a 37 graus por um período para que células de defesa produzam o INF-γ. Posteriormente são centrífugados e avaliados pela técnica ELISA para detectar o INF-γ produzido no plasma. Estes passos exigem aparato de laboratório e mão de obra especializada. Apresenta vantagens frente ao teste de PPD, pois requer uma única coleta de amostra sanguínea não havendo necessidade do veterinário retornar à propriedade rural para leituras subsequentes. Os resultados são objetivos, não requerem interpretação do leitor ou interferência de critérios subjetivos pois trata-se de um teste *in vitro* qualitativo; pode ser repetido várias vezes para confirmação. Enquanto que PPD tem prazo de carência para ser novamente aplicado devido a potenciação da reação tuberculínica. O teste não é afetado pela infecção por outras espécies de microbactérias. Enquanto as limitações da PPD são reação cruzada com microbactérias não tuberculosas; anergia/resultados falsos negativos em pacientes imunocomprometidos ou altamente infectados pela *M. bovis*; risco de erro na mensuração do tamanho do endurecimento cutâneo e necessidade de duas etapas para conclusão do exame (aplicação intradérmica e leitura após 48-72 horas) (MAPA, 2017).

4.2.5 ELISA indireto

O teste indireto imunoenzimático ou ELISA indireto (*indirect enzyme-linked immunosorbent assay*) tem seu protocolo genérico inicial consolidado por Engvall e Perlmann (1971) passando a ser utilizada em diversas modalidades de diagnóstico até os dias de hoje. Segundo estes autores o protocolo desta técnica consiste basicamente em deixar um antígeno proteico extraído do agente infeccioso em contato com uma superfície sólida representada por pequenos poços de uma placa de poliestireno por período de 12 horas.

Assim sendo, por meio de cargas não covalentes, proteínas e outras moléculas do microrganismo lisado fixam-se ao poliestireno. Essa etapa é denominada de sensibilização da

placa. Em seguida, os poços contendo estes antígenos são lavados com solução tampão, a fim de retirar o excesso de detritos do microrganismo que não aderiram ao fundo do poço (ENGVALL; PERLMANN, 1971).

Após o soro a ser testado suspeito de conter anticorpos (anticorpo primário) é adicionado aos poços. Havendo anticorpos específicos que reconheçam o antígeno fixado a placa, estes irão se ligar à camada de antígeno fixado na placa. A seguir, lavam-se os poços para retirar o excesso de soro e de anticorpos primários que não formaram complexos antígeno-anticorpo (ENGVALL; PERLMANN, 1971).

Então, é adicionado aos poços um anticorpo espécie bovina denominado de anticorpo secundário. Ele é quimicamente conjugado a uma enzima, peroxidase ou fosfatase alcalina e, a partir disso, forma um complexo no fundo do poço constituído de antígeno ligado ao anticorpo primário do soro teste que, por sua vez, será detectado pelo anticorpo secundário conjugado a enzima. Realiza-se uma nova lavagem para retirar o anticorpo secundário em excesso (ENGVALL; PERLMANN, 1971).

Finalmente adiciona-se um substrato cromógeno para a enzima ligada ao anticorpo secundário e faz-se leitura em espectrofotômetro para medir a coloração da reação e para indiretamente determinar a quantidade de anticorpo secundário que se ligou ao anticorpo primário do soro teste. Dessa forma, a característica marcante do ELISA indireto é a utilização de anticorpo secundário para um maior nível de especificidade do teste. Numerosas variações do ELISAi têm sido descritas para bovinos, pequenos ruminantes e suínos. Para isso, emprega-se diferentes preparações de antígeno conjugando antiglobulina-enzima e substrato/cromógenos (ENGVALL; PERLMANN, 1971).

De acordo com Garbaccio et al. (2019) os testes intradérmicos podem gerar um falso-negativo, como o fenômeno de anergia que ocorre em alguns animais que apresentam a doença em estado avançado tendo alta carga de micobactérias ou também pode ocorrer devido a infecção recente. Garbaccio et al. (2019) realizaram o teste intradérmico PPD e a técnica de ELISA para 7.494 bovinos de 14 propriedades produtoras de leite e verificaram 200 animais reativos ao ELISA e negativos ao PPD. A seguir foi realizada necrópsia de 33 animais PPD negativos/ELISA positivos e verificou-se que 30 animais apresentavam lesões granulomatosas que permitiram o isolamento de *M. bovis*, mostrando a complementariedade destes testes indicando a grande sensibilidade do ELISA indireto nesta pesquisa.

4.2.6 Adesivos transdérmicos

São adesivos sólidos ou semissólidos contendo micro agulhas que inoculam transdermicamente substâncias diversas e tem sido amplamente utilizado na indústria biomédica para a administração de diferentes tipos de medicamentos, anestésicos, aplicação de vacinas e administração de hormônios como a insulina. O uso do micro-agulhas para inoculação de antígenos tuberculínicos é uma alternativa à técnica de Mantoux de uso humano ou ao PPD bovino. A administração de vacinas ou antígenos por meio de micro-agulhas sólidas e ocas pode ocorrer por várias vias, tais como a perfuração da pele e seguido pela aplicação da formulação da vacina sobre a pele, pelo revestimento, aprisionamento da vacina sobre ou dentro das micro-agulhas para libertação frequente (retardada) de fármaco (RIPOLIN et al., 2017). As micro-agulhas também captaram atenção proeminente no campo dos cosméticos utilizados para o tratamento da acne, pigmentação, cicatrizes e rugas, bem como tonificação da pele, administração de drogas oculares e outros bioactivos (AKHTAR, 2014).

Os adesivos intradérmicos transportam os fármacos e antígenos através da pele diretamente para as células T identificando indivíduos sensibilizados pelo *Mycobacterium bovis*, através da reação de hipersensibilidade tardia (KASEMPIMOLPORN et al., 2019). Os adesivos possuem diferentes apresentações e variadas constituições. Kasempimolporn et al. (2019) utilizaram adesivos de fibra de vidro absorvente com antígenos recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis*, ESAT-6, Rv2653c e PPD padrão para avaliar a reação de hipersensibilidade em cobaias vacinadas com *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG (bacille calmette), e concluiram que o uso de adesivos contendo antígenos específicos permitiu diferenciar os animais vacinados com uma cepa de *M. tuberculosis* e animais vacinados com BCG.

5 REFERÊNCIAS

AKHTAR, N. Microneedles: an innovative approach to transdermal delivery–a review. **International Journal of Pharmacy Pharmaceutical Sciences**, Índia, v. 6, n. 4, p. 18-25, 2014.

ALMEIDA, S. de. **Aula sobre PCR multiplex**: biologia molecular. Porto Alegre: UFCSPA, 2020. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=U4el3fuxod8>. Acesso em: 26 jun. 2020.

ALZAMORA FILHO, F. et al. Identificação de *Mycobacterium bovis* em carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. **Arquivo**

Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 66, n. 5, p. 1585-1591, 2014.

ASHFORD, R. T. et al. Evaluation of the dual path platform (DPP) VetTB assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers. **Preventive Veterinary Medicine,** Nancy**,** v.180, p. 105005, 2020.

CORREA, F. R.; GARCIA, M. Doenças bacterinas: tuberculose. In:_____. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 2. ed. São Paulo: Varela Editoria e Livraria Ltda, 2001. p. 351-361.

ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, Grã Bretanha, v. 8, n. 9, p. 871–874, 1971.

FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. **Sequenciando genomas**. [2020]. Disponível em: <http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/18497/material/Sequ%C3%AAnciamdo%20genomas.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2020.

GARBACCIO, S. G. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay as complement of intradermal skin test for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Tuberculosis**, Londres, v. 117, p. 56-61, 2019.

GHEBREMARIAM, M. K. et al. Genetic profiling of *Mycobacterium bovis* strains from slaughtered cattle in Eritreia. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 4, p. e0006406, 2018.

GONÇALVES, V. G. P. **Investigação epidemiológica e molecular por spoligotyping de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* na população masculina do município de Porto Velho**. 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) - Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2017. Disponível em: <https://ri.unir.br/jspui/handle/123456789/2163>. Acesso em: 15 jun. 2020.

JAPOLLA, G. et al. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral: uma ferramenta rápida de diagnóstico. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 22, p. 26-49, 2015.

JORGE, K. dos S. G. et al. Tuberculose bovina: epidemiologia e controle. In: _____. **Brucelose e Tuberculose Bovina**: epidemiologia, controle e diagnóstico. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 45-76.

KASEMPIMOLPORN, S. et al. Application of transdermal patches with new skin test reagents for detection of latent tuberculosis. **Journal of Medical Microbiology**, Tailândia, v. 68, n. 9, p. 1314-1319, 2019.

KASHI, M. H. et al. Detection and characterization of purified antigenic proteins from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* strain AN5. **Iranian Journal of Microbiology**, Teerã, v. 12, n. 1, p. 25-31, 2020.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2017. Disponível em:

https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/brucelose-e-tuberculose/1IN102017.pdf. Acesso em: 17 jun. 2020.

MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B. de.; ARAÚJO, E. G. de. Western blotting: a técnica e aplicações na pesquisa e rotina diagnóstica em medicina veterinária. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 1704-1719, 2012.

NEVES, S. E. das. **Avaliação da qPCR para determinação de genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência à isoniazida e à rifampicina em amostras de escarros de pacientes multibacilares com tuberculose pulmonar**. 2016. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5475>. Acesso em: 17 jun. 2020.

NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, n. 33, p. 10-13, 2004.

NUNES, M. de. L. **Aplicação da técnica loop-mediated isothermal amplification (lamp) no desenvolvimento de um teste para o diagnóstico da peste**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Programa de Pós Graduação em Ciências, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/31939>. Acesso em: 04 jun. 2020.

OIE - Organização Mundial de sanidade animal. **Tuberculosis bovina**. Paris, 2020. Disponível em: <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/ >. Acesso em: 19 de mai. de 2020.

PACHECO, A. M. et al. Tuberculose bovina: relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 7, n. 13, p. 1-4, 2009.

PALMER, M. V. et al. Biomarkers of cell-mediated immunity to bovine tuberculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Iowa, v. 220, p. 109988, 2020.

PAOLI, T. M. P. de. **Avaliação de risco relativo para tuberculose bovina em municípios do estado do Espírito Santo a partir de dados de matadouros**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2013. Disponível em: <http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_6708_TALITA%20PAOLI20140326-101818.pdf>. Acesso em: 18 mai 2020.

RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, n. 4, p. 830-837, 2015.

RIPOLIN, A. et al. Successful application of large microneedle patches by human volunteers. **International Journal of Pharmaceutics**, Belfast, v. 521, n. 1-2, p. 92–101, 2017.

SILVA, L. B. de. A. et al. Prevalência de lesões sugestivas de tuberculose em bubalinos abatidos no Amapá, Brasil. **PUBVET**, Maringá, v. 8, n. 12, p. 1416-1550, 2014.

SILVA, M. C. da.; MOURA, M. S.; REIS, D. O. Tuberculose – revisão de literatura. **PUBVET**, Maringá, v. 5, n. 17, p. 1106-1111, 2011.

SINGH, U. B. et al. Predominant tuberculosis spoligotypes, Delhi, India. **Emerging Infectious Diseases**, Nova Délhi, v. 10, n. 6, p. 1138, 2004.

SOUZA FILHO, A. F. de. **Genotipagem pela técnica MIRU-VNTR de *Mycobacterium bovis* isolados de tecido bovino**. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufms.br:8443/jspui/handle/123456789/1920>. Acesso em: 26 maio 2020.

SOUZA, M. A. de. et al. Exames complementares no diagnóstico da tuberculose em bovinos reagentes à tuberculinização comparada. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 83, p. 1-8, 2016.

TAO, Y. et al. High-performance detection of *Mycobacterium bovis* in milk using digital LAMP. **Food Chemistry**, Barking, v. 327, p. 126945, 2020.

THORNTON, B.; BASU, C. Rapid and simple method of qPCR primer design. In: _____. **PCR Primer Design**. 2 ed. New York: Humana Press, 2015. p. 173-179.

ZANINI, M. S. et al. *Mycobacterium bovis:* polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spolygotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 809-813, 2001.

Esclarecendo o diagnóstico parasitológico em aves domésticas: atualidades e perspectivas

Sara Oliveira Maia[1]
Matheus Joaquim dos Santos Candido[2]
Isabella Vilhena Freire Martins[3]
Jankerle Neves Boeloni[4]
Júlio Francisco Valiati Marin[5]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: saramaia.o.sm@gmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mcandido0352@gmail.com
[3] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: isabella.martins@ufes.br
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jankerle@gmail.com
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: julio_valiati@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da avicultura no Brasil encontra-se entre as mais eficazes do mundo, uma vez que emprega alta tecnologia nos ramos da climatologia, melhoramento genético, nutrição e controle de doenças infectocontagiosas e parasitárias (VIEIRA, 2010). O alto desenvolvimento das técnicas de manejo, produção e do controle das enfermidades, associado aos investimentos em estrutura, colocou o país como o terceiro maior produtor mundial de frangos de corte (ABPA, 2020) e o maior exportador mundial (4,2 toneladas), e ainda assim, grande parte da produção é destinada para o consumo interno sendo de 42,8 kg per capita. Destaque também para a produção de ovos, somando mais de 49 bilhões de unidades produzidas e um faturamento de 10.631 mil dólares para o país (ABPA, 2020; EMBRAPA, 2020).

As parasitoses em aves domésticas aumentam o desafio de produção e afetam significativamente sua resposta imunológica (VALADÃO, 2018). Sendo assim, locais de densos índices de produção, com grande número de animais em um mesmo ambiente associado a más práticas de manejo sanitário, elevam o acometimento de doenças infectocontagiosas, gerando altos prejuízos econômicos (MATTOS; ROSSATO; ANTONUCCI, 2019).

Visando estimar e demonstrar os principais parasitos na avicultura comercial, Mattos, Rossato e Antonucci (2019) destacaram os protozoários (coccídios) e os helmintos (nematódeos, cestódeos e trematódeos) como os principais agentes parasitários em aves domésticas. Segundo Baptista (2010), os parasitos mais comumente encontrados em aves domésticas pertencem aos gêneros *Eimeria* spp., *Ascaridia* spp., *Heterakis gallinarum* e *Capillaria* spp., cujos ciclos são diretos, e ainda prosperam em aviários onde o manejo e as boas práticas de higiene não são levados em consideração. Com relação aos ectoparasitos das aves, destacam-se no Brasil: os ácaros plumícolas, os carrapatos moles e duros, os piolhos malófagos e as moscas, em especial os hiposboscídeos (ARZUA; VALIM, 2010).

Sabendo da notoriedade da avicultura na economia do país, é imprescindível a publicação de trabalhos atualizados na área, afim de direcionar estudantes, profissionais da área, produtores do ramo, novos meios de esclarecimentos em um setor tão carente de atualizações. Sendo assim, o presente capítulo tem por objetivo realizar revisão bibliográfica sobre o diagnóstico das infecções e infestações parasitárias em aves domésticas, de modo a esclarecer as principais consequências clínico patológicas do parasitismo em aves e as particularidades na coleta, envio e processamento do material para diagnóstico dessas enfermidades.

2 COLETA, FIXAÇÃO E ENVIO DE AMOSTRAS

Os exames parasitológicos utilizados no diagnóstico de ecto e endoparasitoses são essenciais para avaliar a carga parasitária individual ou de lotes de aves domésticas. No entanto, para o diagnóstico de doenças parasitárias tornam-se indispensáveis métodos corretos de coleta das amostras, forma de conservação, armazenamento e transporte ao laboratório (SNAK et al., 2014).

Os materiais que podem ser coletados incluem fezes frescas (SIQUEIRA; MARQUES, 2016); cama de aviário (CAMPOS et al., 2018); penas (FERREIRA; BEZERRA; AHID, 2010); sangue (BRUM et al., 2016); aves vivas (SOARES et al., 2008), mortas (GOMES et al., 2009) ou fragmentos de tecido (FREITAS et al., 2008) utilizados e coletados durante necropsia parasitológica e o espécime parasito propriamente dito (ENOUT et al., 2009), estando o método de coleta diretamente relacionado à amostra que será enviada.

De acordo com Amato e Amato (2010) as fezes de aves podem ser coletadas durante a realização da avaliação clínica quando ocorre eliminação espontânea, da caixa de transporte, das gaiolas/recintos, de cama de aviários ou diretamente nas porções intestinais durante o exame de necropsia parasitológica.

Para aves que são alojadas em gaiolas, a coleta deverá ser realizada forrando-se o fundo da gaiola com papel alumínio colocado um dia antes da realização do exame e mantidas sob refrigeração até o envio ao laboratório (CARNEIRO; CALAIS JÚNIOR; MARTINS, 2011). As amostras de fezes coletadas na cama, devem ser retiradas de vários pontos do galpão, no entanto, durante o exame de necropsia parasitológica, as fezes podem ser coletadas dos intestinos (AMATO; AMATO, 2010) ou somente do reto (GOMES et al., 2009).

Independentemente do método de coleta, as amostras de fezes devem ser acondicionadas em frascos limpos ou sacos plásticos, identificadas corretamente e enviadas refrigeradas entre 2 e 8 °C ao laboratório, devendo-se realizar os exames coproparasitológicos entre 24 e 48 horas, no máximo (AMATO; AMATO, 2010).

Outro método de fixação de amostras de fezes de aves, principalmente quando não há possibilidade de realização do exame coproparasitológicos em até 48 horas, será a utilização de potes individuais contendo solução MIF (merthiolate, iodo e formol) (BRITO et al., 2017).

A pesquisa de ectoparasitos de aves está diretamente relacionada ao exame das penas e pele, podendo ser coletadas juntamente com espécimes observados durante a avaliação clínica, ambiente e instalações como gaiolas e cama, ou durante exame de necropsia parasitológica. As penas infestadas com ácaros e piolhos podem ser removidas com auxílio de pinça e o material

deve ser acondicionado em frascos individuais, devidamente identificados, por ave avaliada e por região anatômica coletada, e conservados em álcool 70º GL para posterior envio ao laboratório de parasitologia e identificação taxonômica (FERREIRA; BEZERRA; AHID, 2010).

Na coleta de amostras de sangue para pesquisa de hemoparasitos, as aves devem ser contidas, o sangue coletado por punção da veia braquial, em seringas descartáveis tipo insulina (1 mL) acoplada a agulha (13 x 4), não deve exceder a 1 % do peso vivo do animal e depois depositado em frascos de vidro contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10 % (BRUM et al., 2016). No entanto, o uso de EDTA causa hemólise da amostra, devendo ser utilizado heparina (TODD; PLASSE; ECKART, 1999). Para amostras de soro, sugere-se utilização de tubos de coleta a vácuo preparados com heparina de lítio, devido ao processo de geleificação relacionada à coagulação, o que impede a realização de testes (HARR, 2002).

O preparo de esfregaço sanguíneo em lâmina de vidro deverá ser realizado após a coleta em tubo (BRAGA; BELO; PINHEIRO, 2010), fixadas em álcool metílico, identificadas, acondicionadas em caixas próprias para lâminas ou tubo de transporte e enviadas ao laboratório.

Na realização do exame de necropsia parasitológica de aves devem ser coletados parasitos e fragmentos de órgãos contendo alterações macroscópicas relevantes para posterior envio seguido de identificação em laboratório. A coleta de parasitos com intuito taxonômico deve ser acompanhada de exame do hospedeiro onde o parasito foi encontrado, reconhecimento do parasito, remoção, limpeza e preservação dos mesmos para posterior estudo, uma vez que os endoparasitos, principalmente do trato digestivo, deterioram-se rapidamente após a morte da ave (AMATO; AMATO, 2010).

Os fragmentos de tecidos coletados durante a necropsia devem ser delgados e fixados/conservados logo após o exame para evitar autólise, não sendo aconselhado o congelamento. A fixação deverá ser feita com formol 10 % tamponado (KAP et al., 2011), mas também poderá ser realizada com AFA (93 % álcool, 70 % GL, 5 % formol comercial e 2 % ácido acético) (MENEZES; MATTOS JÚNIOR; TORTELLY, 2001). O frasco deve ser vedado, identificado e acompanhado do formulário para solicitação de exames.

A melhor forma de coleta e preparo para fixação de parasitos em fase adulta está diretamente relacionada ao tipo de parasito. Amato e Amato (2010) especificam que, para helmintos digenéticos, cada órgão deve ser aberto dentro de um recipiente e o conteúdo passado através de peneira com malha de 100 μm ou 154 μm de abertura; proceder a lavagem do conteúdo e da mucosa do órgão; comprimir os espécimes grandes entre lâminas, os pequenos entre lâmina e lamínula, mas não comprimir muito; amarrar as lâminas com linha e dispor na

vertical, no fixador AFA, por algumas horas. Para cestoides, promover o relaxamento da musculatura sob ação do frio no refrigerador; após a morte, devem ser comprimidos e fixados em temperatura ambiente entre lâminas; para os acantocéfalos deve-se proceder a morte em água destilada no refrigerador, para o relaxamento da musculatura, eversão da probóscide e da bolsa copuladora; após a morte, devem ser agitados em água ou solução para limpeza; comprimir entre lâminas e dispor em solução fixadora por um período maior que 24 horas.

Ainda, para os nematoides, os espécimes devem ser coletados preferencialmente vivos; transferidos para um frasco contendo solução salina, solução de limpeza ou água de torneira, e agitar vigorosamente, transferir para um recipiente contendo fixador AFA aquecido a 65 ºC; manter por 48 horas no fixador; e após finalizado, transferir para o líquido conservador (etanol 70º GL, etanol com 5 % ou 10 % de glicerina) (AMATO; AMATO, 2010).

3 DIAGNÓSTICO DOS PRINCIPAIS CAUSADORES DE PROBLEMAS PARASITÁRIOS EM AVES DOMÉSTICAS

3.1 ECTOPARASITOS

Os ectoparasitos são organismos que parasitam seus hospedeiros de maneira exógena, ou seja, ficam na superfície do animal ou na pele, podendo causar fenômenos de infestação (BOWMAN et al., 2010). A vasta correlação dos ectoparasitos com as aves domésticas, implicou em subdivisões de acordo com período do parasitismo em permanentes e temporários (SANTOS et al., 2018) e, em sua grande maioria, possuem alta especificidade com relação ao local no organismo do seu hospedeiro (ARZUA; VALIM, 2010).

O diagnóstico parasitológico dos ectoparasitos é feito macroscopicamente avaliando a superfície corpórea do animal e identificando o parasito. Para diagnóstico diferencial, recomenda-se encaminhar os espécimes para laboratório especializado (SANTOS et al., 2018). A ferramenta utilizada para identificar efetivamente os parasitos externos são as chaves taxonômicas, com descrições baseadas na morfologia específica de cada região anatômica do espécime. Visto que cada família ou grupo tem uma chave taxonômica confeccionada para caracterizar parâmetros morfológicos diferenciais a fim de organizar e direcionar para a identificação do parasito desejado (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

3.1.1 Malófagos

Os malófagos ou piolhos mastigadores fazem, atualmente, parte da ordem Phitiraptera e são insetos ápteros, achatados dorso-ventralmente com aparelho bucal apresentando mandíbulas. Várias espécies de piolhos podem infestar aves domésticas, principalmente as subordens Amblycera e Ischnocera (ARZUA; VALIM, 2010). Passam a maior parte do seu ciclo de vida no hospedeiro e causam irritação à medida que se alimentam da pele e das penas (PATTI, 2002).

Os principais piolhos mastigadores de aves domésticas são dos gêneros *Menopon, Menacanthus, Lipeurus, Columbicola* e *Chelopistes*, sendo frequentemente encontrados ao redor da cloaca, peito e coxas. O diagnóstico da presença de piolhos pode ser realizado por avaliação da pele e plumagem da ave, observando o parasito (PATTI, 2002; TAYLOR; COOP; WALL, 2016), mas depende de uso de chaves taxonômicas para identificação específica.

3.1.2 Ácaros

Dos ácaros de importância para a avicultura, podem ser citadas as famílias Knemidocoptidae, Dermanyssidae (BOWMAN et al., 2010) e Epidermoptidae (SANTOS et al., 2018).

Popularmente conhecida como “sarna das patas”, essa enfermidade tem caráter crônico e é causada por *Knemidocoptes mutans,* ácaros de tamanho muito pequeno (fêmeas de 0,5 mm de diâmetro e machos ainda menores) (BOWMAN et al., 2010) com corpo arredondado, sendo geralmente encontradas nas escamas que recobrem o metatarso (SANTOS et al., 2018). Esses ácaros cavam por dentro da epiderme das patas, causando sua destruição podendo afetar aves de qualquer idade. Geralmente, aves poedeiras são mais infestadas por necessitarem de maior período para evolução do quadro clínico. As lesões características são: dermatites, crostas, deformação das escamas e para diagnóstico rápido, deve-se observar nas crostas a morfologia dos ácaros (SANTOS et al., 2018).

O ácaro *Knemidokoptes gallinae* é o causador da “sarna das penas” localizado superficialmente em região abdominal, base das penas do dorso, na parte de cima das asas e ânus, peito e coxas, causando depenação e prurido (BOWMAN et al., 2010; SANTOS et al., 2018). Esse ácaro é altamente contagioso e de rápida evolução, sendo que o diagnóstico pode ser feito pela observação desse parasito nas áreas afetadas, com uma lupa, uma vez que causam lesões irritativas e inflamatórias (dermatites) (SANTOS et al., 2018).

Os ácaros do gênero *Dermanyssus* são conhecidos como "ácaros vermelhos". São eles quem causam parasitose temporária e são dificilmente encontrados nas aves, pois ficam alojados nos ninhos e poleiros (BOWMAN et al., 2010). De caráter crônico insidioso, a evolução do quadro clínico depende da infestação no animal, raramente causam lesões cutâneas e anemia, mas podem levar a sinais de anorexia e queda na produção. O diagnóstico baseia-se na análise do habitat dos animais infestados devido ao caráter de parasitismo temporário (SANTOS et al., 2018).

Outros ácaros que acometem frequentemente as aves são os carrapatos, ectoparasitos hematófagos que vão aos hospedeiros em diversas fases para se alimentar e para completar o seu ciclo biológico. Possuem duas famílias parasitando aves domésticas no país: Argasidae e Ixodidae (ARZUA; VALIM, 2010), no entanto não há relato de espécie de ixodídeo de importância no Brasil (PATTI, 2002).

Os argasídeos, ou carrapatos moles, não possuem escudo dorsal, apresentam hábitos noturnos e vivem em esconderijos, nos quais se deslocam até o hospedeiro para realizar o repasto sanguíneo, permanecendo a maior parte do ciclo fora do hospedeiro (ARZUA; VALIM, 2010; PATTI, 2002). No Brasil, *Argas miniatus* é o único carrapato desta família que parasita aves domésticas (GUIMARÃES; TUCCI; BARROS-BATTESTI, 2001). De acordo com seu meio de alimentação hematófago, podem veicular a transmissão de bactérias como as do gênero *Borrelia*, e causar quadros anêmicos e hemorragias na pele (PATTI, 2002). As larvas dessa espécie de argasídeo podem induzir em aves jovens uma paresia, conhecida por "Tick Paralysis", a ocorrência e a gravidade desse processo patológico depende da quantidade de neurotoxina que é liberada nos tecidos, que ocorre principalmente no final do ingurgitamento das larvas (MANS; GOTHE; NEITZ, 2004).

3.1.3 Moscas

3.1.3.1 Hipoboscídeos

Hipoboscídeos são moscas hematófagas adaptadas ao ectoparasitismo e que possuem nas patas garras projetadas para adesão nas penas e pelos do hospedeiro (SERRA-FREIRE; MELLO, 2006) e tendem a saltar de um hospedeiro para o outro ao invés de voar, como moscas convencionais, não necessitando do contato direto para a transmissão (ARZUA; VALIM, 2010). A principal espécie de hipoboscídeo de importância no Brasil é *Pseudolynchia*

canariensis, conhecida como mosca do pombo e responsável por transmitir o protozoário *Haemoproteus* às aves (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

3.1.3.2 Gênero *Fannia*

A espécie *Fannia canicularis* possui como particularidade larvas flutuadoras que podem ser encontradas nos bebedouros das aves, auxiliando no diagnóstico macroscópico. Clinicamente, não causam danos às aves domésticas, mas servem de hospedeiro intermediário para o cestoide *Raillietina* sp., esse por sua vez provoca perda de peso e queda na postura (BAPTISTA, 2010; MARTINS, 2019).

3.2 HELMINTOS

As helmintoses afetam o desempenho das aves, causando perdas diretas ou indiretas, associados a problemas de saúde e bem-estar (THAPA et al., 2015). Os helmintos também podem ocasionar aumento na susceptibilidade de infecções secundárias, como *Pasteurella multocida* (DAHL et al., 2002), além de serem vetores para transmissão de infecções patogênicas, como do protozoário *Histomonas meleagridis* (MCDOUGALD, 2005).

Estudo recente desenvolvido por Valadão (2018), propôs uma análise parasitológica dos helmintos de *Gallus gallus* criados de forma extensiva. Dessa forma, observou-se que a elevada taxa de parasitoses gastrintestinais mistas (83,77%) associadas às condições ambientais e manejo, favorecem o contato do animal com estágios infectantes de parasitos e hospedeiros intermediários, disseminando ainda mais as helmintoses.

Por sua ampla variedade, os helmintos podem ser divididos por grupos de forma a direcionar o local de predileção do parasitismo, lesões mais comuns, sinais clínicos e os achados macroscópicos e microscópicos que irão direcionar o diagnóstico parasitológico final. Sendo assim, esses helmintos são divididos em nematoides, platelmintos (cestoides e trematódeos) e alguns exemplares do filo acantocéfala, que também acometem as aves (PARRA, 2019).

3.2.1 Nematoides de aves

Os nematoides constituem o grupo mais importante de endoparasitas na criação moderna de aves, pois são considerados os mais patogênicos e os que geram maior impacto econômico (GOLYNSKI, 2003). Possuem o corpo cilíndrico e anexos cuticulares, sistema

digestivo completo e são dioicos (SOULSBY, 1987). Podem ter ciclo direto via transmissão horizontal (aves para aves), pela ingestão de larvas ou ter ciclo indireto requerendo um hospedeiro intermediário como insetos e moluscos (BOWMAN et al., 2010).

Em caráter diagnóstico, particularmente a ascaridíase não causa grande confusão durante a necropsia, uma vez que o parasito pode ser visto em grande quantidade a olho nu no intestino delgado. Em exames coproparasitológicos, pode-se utilizar o método de flutuação e observar os ovos na microscopia (MEDIAVILLA, 2008).

O diagnóstico para *Heterakis galinarum* pode ser feito macroscopicamente por visualização dos parasitos no ceco das aves, durante a necropsia, ou pela identificação microscópica dos ovos nas fezes em técnicas coproparasitológicas (PARRA, 2019).

O diagnóstico de *Syngamus trachea* pode ser feito macroscopicamente utilizando uma fonte de luz sobre a traqueia do animal, com a boca aberta, sendo possível observar estruturas avermelhadas em forma de "Y" (macho e fêmea acasalados). Microscopicamente, podem ser vistos após swab traqueal estéril ou lavado. Outra opção é a observação de ovos bioperculados, grandes e morulados no exame de flutuação do material fecal (MATTIELLO, 2011).

Para o diagnóstico de *Tetrameres* spp., deve-se direcionar para exame necroscópico, onde o proventrículo apresenta parede edemaciada associada à presença dos parasitas (COELHO et al., 2011). Microscopicamente, pode-se observar fêmeas incluídas na parede glandular do órgão e machos na superfície da mucosa (MACHADO; LIMA; ARAÚJO, 2006).

Para os demais endoparasitos citados, o método diagnóstico do gênero *Capillaria* spp. baseia-se na análise dos ovos nas fezes pela técnica de flutuação em microscopia (MATTIELLO, 2011). Para o diagnóstico de *Gongylonema* sp., o método específico é a visualização macroscópica do parasito no papo do animal parasitado, assim como o diagnóstico de *Oxyspirura mansoni* é baseado na visualização macroscópica na região ocular das aves (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

Segundo levantamentos feitos por Menezes, Mattos Júnior e Tortelly (2001), para o diagnóstico dos parasitos *Cheilospirura hamulosa* e *Dispharinx spiralis,* deve-se levar em consideração as lesões macroscópicas em proventrículo e moela, como dilatação do órgão, nódulos, congestão da serosa, erosões e pontos hemorrágicos na mucosa e muco no lúmen. Além disso, realizar coleta do material suspeito para análise microscópica para diagnóstico preciso dos parasitos.

Na Tabela 1 podem ser observados os principais gêneros de parasitos que acometem aves domésticas, seu local de parasitismo e os principais danos no hospedeiro.

Tabela 1 – Nematoides parasitos de aves domésticas no Brasil, seus locais de parasitismo e alterações clínico-patológicas.

Nematoides	Local de parasitismo	Alterações clínico-patológicas
Ascaridia spp.	ID, Proventrículo, IG, Esôfago. (REVOLLEDO; PIANTINO FERREIRA, 2008).	Anemia, anorexia, má absorção de nutrientes e infecções intestinais graves, podendo levar ao óbito (VITA, 2013).
Heterakis galinarum	Ceco	Tiflite crônica (SOBRAL, 2010). Hospedeiro intermediário de *Histomonas meleagridis* (VITA, 2013).
Sygamus trachea	Traqueia, brônquios e bronquíolos (MARQUES, 2006).	Anemia, fraqueza, emaciação, enterite, diarreia sanguinolenta, dispneia, tosse, bico aberto, pescoço esticado, asfixia pelo muco na traqueia, podendo levar a morte (BAPTISTA, 2010).
Tetrameres sp.	Proventrículo	Úlceras e hemorragias na mucosa, proventriculite, edema e obstruções, podendo causar um cisto ao redor do órgão, diarreia e emagrecimento (COELHO et al., 2011).
Capilaria spp.	Papo, esôfago, e intestino delgado (EHLERS, 2012).	Caquexia, perda de peso, diarreia, asas descaídas, apatia, sonolência, infecções, anemia e evolução para óbito (BAPTISTA, 2010).
Gongylonema sp.	Inglúvio	Em geral são pouco patogênicos, podem causar regurgitação (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).
Cheilospirura hamulosa	Moela	Pode causar nódulos na musculatura da moela diminuindo a capacidade de maceração e aproveitamento dos alimentos (MONTEIRO, 2010).
Dispharynx spiralis	Proventrículo	Causa proventriculite proliferativa catarral crônica (GOBLE; KUTZ, 1945).
Oxyspirura mansoni	Sob a membrana nictitante do olho (MENEZES; MATTOS JÚNIOR; TORTELLY, 2001).	Sem lesões macroscópicas, mas o lacrimejamento pode causar estresse e, em casos graves, oclusão das vias nasais e cegueira (MENEZES; MATTOS JÚNIOR; TORTELLY, 2001).

ID: intestino delgado; IG: intestino grosso; HI: hospedeiro intermediário.

3.2.2 Platelmintos de aves

Os platelmintos são simétricos bilateralmente, comprimidos dorso-ventralmente, e por esse motivo são denominados de “vermes achatados”. Formados basicamente por parênquima,

possuem os órgãos, fibras musculares, células secretórias e células regenerativas, onde estão distribuídos (BOWMAN et al., 2010).

Os cestoides são parasitos bem comuns em aves domésticas. Possuem aspecto segmentado e cada proglótide pode gerar um novo organismo, uma vez que são hermafroditas. Normalmente as aves não apresentam sinais clínicos da infecção parasitária, a não ser que tenham uma infecção maciça ou estejam imunodebilitadas. Os principais exemplares são *Raillietina* spp., *Hymenolepis* spp., *Davainea proglotina* e *Amoebotaenia* spp. (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

Os trematódeos, helmintos digenéticos, necessitam de hospedeiros intermediários para completarem seus ciclos biológicos (MARTINS, 2019), que geralmente são moluscos aquáticos ou terrestres. Os órgãos de predileção da forma adulta são do trato gastrointestinal, incluindo esôfago, intestinos, ceco e cloaca, além do trato respiratório, como traqueia e sacos aéreos (ROBERTS; JANOVY; NADLER, 2013). Dentre as principais espécies de trematódeos que acometem as aves domésticas, estão *Brachylaemus mazantii*, *Phostarmostomum gallinum* e *Tanaisia bragai* (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

Para detecção de ovos de cestoides e de trematódeos em exames coproparasitológicos, faz-se necessário a coleta de fezes e envio ao laboratório especializado, sendo possível determinar a infecção pelo grupo e pelas características dos ovos, disponíveis na literatura. São indicadas técnicas com o líquido de flutuação com maior gravidade para flutuação dos ovos (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

Quanto ao diagnóstico dos parasitos na necropsia, a maioria dos cestoides e trematódeos podem ser observados com facilidade a olho nu em seus diferentes locais de parasitismo (TABELA 2). Com o espécime intacto, observa-se as características microscopicamente e é possível diferenciá-los a partir de tamanho e características detalhadas, assim como visualização do rostelo, ganchos, entre outras (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

O cestoide *D. proglotina* é pequeno, mas pode causar hemorragia necrótica que pode ser fatal em aves jovens, assim como *Raillietina* spp. que pode induzir enterite hiperplásica e variados nódulos caseosos. Enquanto o *Hymenolepis* spp., é um parasito de até 8 cm de comprimento, e é normalmente considerado de baixa patogenicidade, podendo ocasionar diarreia (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

O diagnóstico para os trematódeos digenéticos *Brachylaemus* spp. e *Phostarmostomum gallinum* consiste na diferenciação morfológica, na qual o primeiro possui o ceco retilíneo e o último ceco sinuoso. Ambos podem causar inflamação cecal e intestinal (MARTINS, 2019).

Para determinar a infecção pela *Tanaisia bragai*, é importante ter atenção ao local de parasitismo, distinto dos anteriores. O diagnóstico é realizado pelo exame coproparasitológico, em virtude da excreção ser realizada pelo proctodeu, todavia, na coleta do espécime na necropsia, pode ser feita a confirmação através das características morfológicas. Na inspeção macroscópica, o fígado pode apresentar manchas amareladas e no histopatológico, espessamento dos ductos coletores, adelgaçamento das paredes, reação inflamatória e pontos de calcificação em algumas regiões do rim (COSTA et al., 2015).

Na Tabela 2 podem ser observados os principais gêneros de platelmintos que acometem aves domésticas, seu local de parasitismo e os principais danos ao hospedeiro.

Tabela 2 – Principais platelmintos parasitos de aves domésticas no Brasil, seus locais de parasitismo e alterações clinico-patológicas.

	Platelmintos	**Local de parasitismo e alterações clínico-patológicas**
Cestoda	*Raillietina* spp.	Parasito do ID, predispõe a formação de nódulos – semelhante aos tuberculosos – favorecendo infecções bacterianas secundárias. Queda no ganho de peso, e produção (BAPTISTA, 2010; SAIF et al., 2003).
	Davainea proglotina	Parasito do duodeno, causa inflamação intestinal, queda de produção e perda de peso (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).
	Amoebotaenia spp.	Parasito do ID e duodeno, possui baixa patogenicidade (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).
	Hymenolepis spp.	Parasito do duodeno, podendo levar a menor ganho de peso (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).
Trematoda	*Brachylaemus* spp.	Parasito do ID, podendo gerar inflamação intestinal (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).
	Phostarmostomum gallinum	Parasito do ceco das aves, pouco patogênico, podendo causar tiflite (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).
	Tanaisia bragai	Parasito das vias urinárias e rins. Causa apatia, perda de peso, diarreia e morte, quando em cargas parasitárias elevadas (COSTA et al., 2015).

ID: intestino delgado.

3.2.3 Filo Acanthocephala

Os helmintos do filo Acanthocephala são parasitos de simetria bilateral, cilíndricos, com ganchos na extremidade anterior que facilitam a fixação do parasito no hospedeiro, e na parte posterior abertura genital. Possuem dimorfismo sexual e não apresentam aparelho digestivo

completo (TRAVASSOS, 1950). Por possuir ciclo de vida heteroxeno, necessita de um hospedeiro intermediário (geralmente, artrópodes), por isso comumente são encontrados em aves insetívoras (geralmente em seu trato gastrointestinal) (NORTON; RUFF, 2003).

As diferentes fases de desenvolvimento desses helmintos podem ser encontradas nas aves domésticas, as formas adultas geralmente são encontradas no sistema digestivo e as larvas em órgãos diversos, como fígado e mesentério (NICKOL, 1995). Em aves domésticas, tem-se relato de *Polymorphus* spp., que se instalam no intestino delgado, e tem os crustáceos como hospedeiros intermediários (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

O diagnóstico de *Polymorphus* spp. em aves é determinado por meio da identificação de ovos no exame coproparasitológico ou dos parasitos adultos na necropsia. Os ovos em forma de fuso possuem casca irregular afinando em direção aos polos e externamente uma fina camada de cor alaranjada. Geralmente, no local de parasitismo há formação de nódulos e uma infecção intensa pode ser fatal (TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

Visando uma apresentação concisa dos principais ecto e endoparasitos em aves domésticas, a Figura 1 demonstra os principais ovos/oocistos visualizados pelo exame coproparasitológico, enquanto a Figura 2 representa um esquema dos principais parasitos e seu respectivo local de predileção.

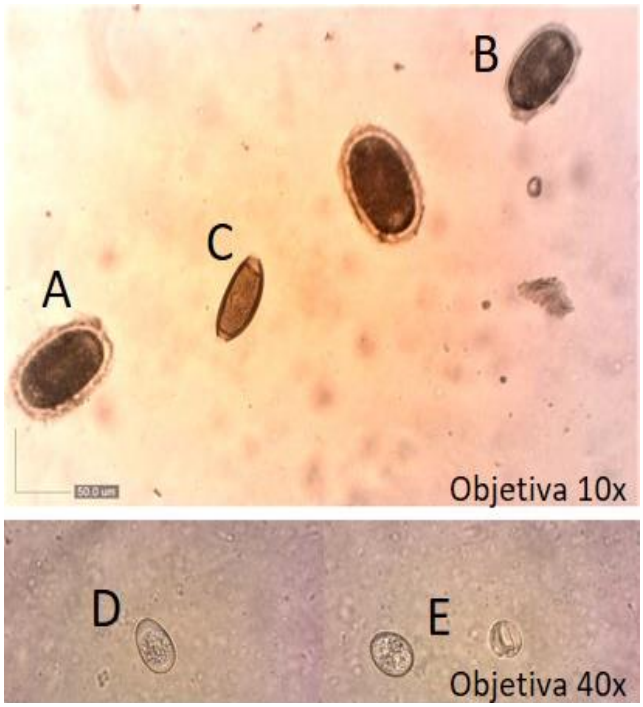

Figura 1 – Principais ovos/oocistos diagnosticados no exame coproparasitológico de aves. Ovos dos helmintos dos gêneros *Ascaridia* (A), *Heterakis* (B) e *Capilaria* (C) e oocistos não esporulados (D) e esporulados (E) de *Eimeria* spp.
Fonte: Os autores.

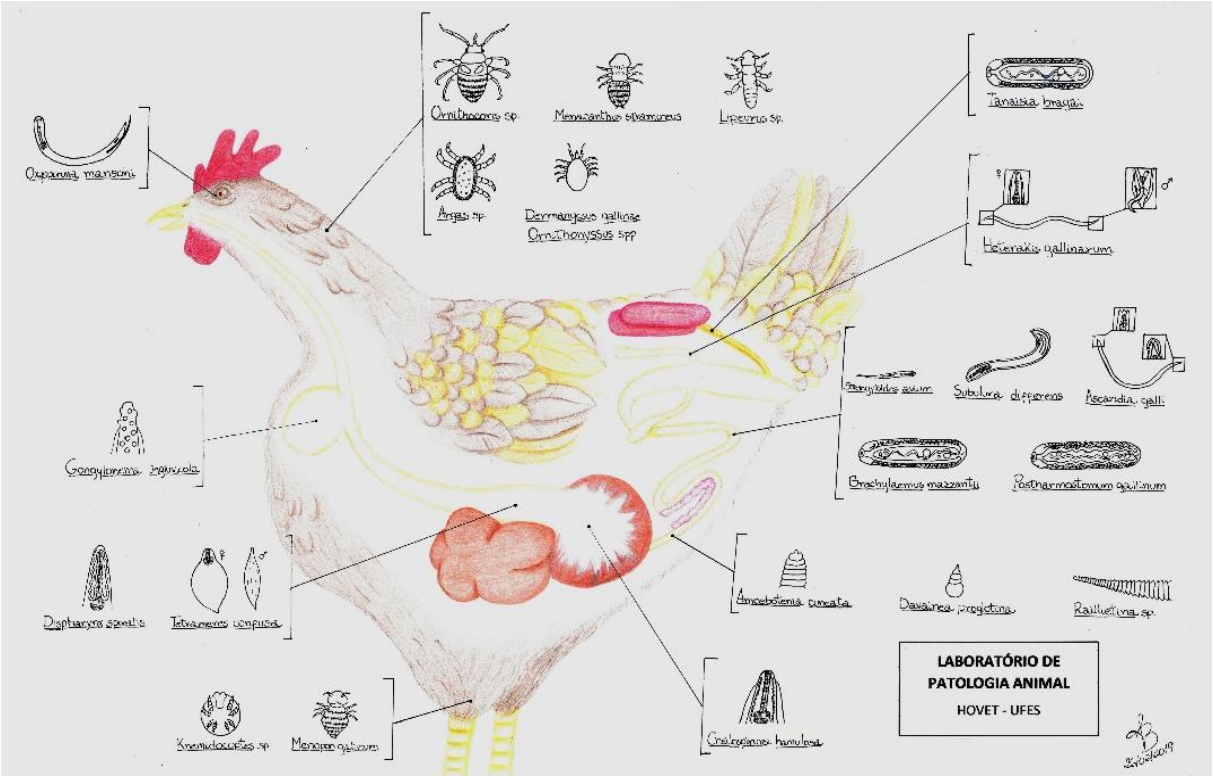

Figura 2 – Desenho esquemático ilustrando os principais ectoparasitos e helmintos de aves domésticas, evidenciando os locais de parasitismo, os nomes científicos e a morfologia.
Fonte: Laboratório de Patologia Animal – HOVET-CCAE-UFES, [2020].

3.3 PROTOZOÁRIOS

Os protozoários são os maiores causadores de prejuízos econômicos para o setor produtivo de aves comerciais, podendo causar desde infecções subclínicas até a morte das aves (MATTOS; ROSSATO; ANTONUCCI, 2019). São organismos unicelulares, eucariontes, com organelas adaptadas ao parasitismo, membrana lipoproteíca para limitar as trocas e são uninucleados (SOULSBY, 1987). Dentre os principais grupos estão os causadores da histomoníase, infecções por *Plasmodium* e *Haemoproteus*, e das coccidioses.

3.3.1 Histomoníase

Histomoníase, entero-hepatite infecciosa ou doença da cabeça negra das aves é causada por um protozoário extracelular de aves domésticas denominado *Histomonas meleagridis*, podendo ser transmitido por meio da ingestão de ovos do helminto *Heterakis gallinarum* contendo o protozoário, sendo uma forma de resistência aos fatores ambientais (MCDOUGALD, 2005).

Clinicamente os animais apresentam apatia, asas caídas, fezes amarelo-enxofre e caquexia. Como o ceco é o local de predileção desse parasito, ocorre tiflite intensa com espessamento e ulceração da parede (CEOLIN; LOVATO, 2012; PARRA, 2018).

Para o diagnóstico, pode-se observar lesões durante a necropsia como a presença de material caseoso amarelo-esbranquiçado ocupando toda a luz do lúmen do ceco das aves afetadas, além de placas necróticas no fígado. Microscopicamente, o *H. meleagridis* é visualizado nas paredes do ceco e nos focos de necrose do fígado (CEOLIN; LOVATO, 2012). Segundo estudo de Costa et al. (2018), a microscopia do ceco pode apresentar intensa deposição de material fibrinonecrótico, com infiltrado de macrófagos e heterófilos íntegros e degenerados se estendendo da mucosa até a serosa, caracterizando um quadro de tiflite. O fígado pode apresentar áreas multifocais extensas de necrose e intenso infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, heterófilos e alguns linfócitos.

3.3.2 Ordem Haemosporida

Os hemoparasitos dos gêneros *Haemoproteus* e *Plasmodium* são protozoários intracelulares de hemácias mais frequentes em aves domésticas, conhecidos também como Haemosporideos (PADOVEZI, 2010). Sua transmissão ocorre por meio de insetos hematófagos, como *Pseudolynchia canariensis*, responsável pela transmissão do *Haemoproteus* sp. (SOULSBY, 1982), e os mosquitos da família Culicidade, responsáveis pela transmissão de todas as espécies de *Plasmodium* sp., causadores da malária (SAIF et al., 2003).

A grande maioria das aves parasitadas pelo *Haemoproteus* sp. não apresentam sintomatologia clínica, mas quando os sinais clínicos ocorrem estão associados ao parasitismo intra-eritrocitário (CARDONA; IHEJINIKA; BENETT, 2002). Aves infectadas e diagnosticadas com malária aviária demonstram alterações como anemia, fraqueza, anorexia e eriçamento das penas (ATKINSON, 2008).

O método utilizado para o diagnóstico é o esfregaço sanguíneo, prezando por coleta de regiões periféricas do animal. Nesse exame, pode-se detectar gametócitos no citoplasma das hemácias, coradas pelas técnicas de panótico rápido ou giemsa (PADOVEZI, 2010).

3.3.3 Coccídea

Os coccídios possuem alta patogenicidade para aves industriais que os adquirem via infecção oral (RENNÓ et al., 2008). A coccidiose apresenta grande importância clínica por

causar enterite e diarreia sanguinolenta, com diminuição na absorção alimentar, anemia, plumagem eriçada, podendo ser porta de entrada para doenças secundárias (PENHA, 2008). Por serem protozoários intracelulares obrigatórios do epitélio intestinal das aves, se desenvolvem e replicam causando destruição das células e do tecido intestinal (SOAVE, 2011).

O diagnóstico específico de coccidioses leva em consideração aspectos como morfologia e contagem de oocistos nas fezes das aves e observação de lesões macroscópicas intestinais levando sempre em consideração os locais de predileção de cada espécie (TABELA 3). Após análise macroscópica dos locais sugestivos do parasitismo, recomenda-se fazer uma coleta de amostra com um swab estéril para posterior análise coproparasitológica por microscopia para observação dos oocistos (CONWAY; MCKENZIE, 2007).

Tabela 3 – Principais espécies de *Eimeria* spp. parasitos de aves domésticas no Brasil, seu local de parasitismo e alterações anatomopatológicas.

Espécies do gênero *Eimeria*	**Local de parasitismo**	**Alterações anatomopatológicas**
Eimeria acervulina	Duodeno e ID anterior.	Causa enterite catarral e macroscopicamente observam-se pontos esbranquiçados transversais no duodeno.
Eimeria brunetti	Porção distal do ID, porção medial do IG e reto.	Causando em infecções graves, enterite necrótica.
Eimeria maxima	Região mediana do ID; duodeno e íleo.	Enterite hemorrágica e espessamento da parede intestinal.
Eimeria mitis	Porção distal do ID.	Não causa lesões macroscópicas, mas se pode encontrar petéquias em porção proximal do IG com muco em todo lúmen.
Eimeria necatrix	Terço médio do ID.	Edema com manchas brancas (intestino em balão) com petéquias e exsudato sanguinolento.
Eimeria praecox	Porção anterior do ID.	Não causa lesões macroscópicas, mas encontra-se exsudato mucoide em todo lúmen.
Eimeria tenella	Ceco (toda extensão).	Tiflite hemorrágica e hemorragia no lúmen cecal, com espessamento da parede.

ID: intestino delgado; IG: intestino grosso.
Fonte: Taylor, Coop e Wall (2016) e Vita (2013).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

À luz dos argumentos mencionados, observa-se uma infinidade de espécies de parasitos que acometem aves domésticas das mais variadas formas, causando danos à saúde do animal e prejuízos econômicos. O presente capítulo expõe, ao promover revisão bibliográfica atualizada no ramo, a necessidade de se coletar e fixar corretamente as amostras para processamento em laboratórios especializados, demonstrando para profissionais, estudantes e produtores da avicultura a importância de direcionamento eficaz para o correto diagnóstico parasitológico afim de minimizar perdas em todas as áreas do setor.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos a médica veterinária Iolanda Simões Braga pela confecção do desenho esquemático utilizado neste trabalho.

6 REFERÊNCIAS

ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual**, 2020. Disponível em: < http://abpa-br.org/relatorios/>. Acesso em: 30 mai. 2020.

AMATO, J.; AMATO, S. Técnicas gerais para coleta e preparação de helmintos endoparasitos de aves. In: MATTER, S. V. et al. **Ornitologia e conservação**: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento. 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010, p. 369–393.

ARZUA, M.; VALIM, M. P. Bases para o estudo qualitativo e quantitativo em aves. In: MATTER, S. V. et al. **Ornitologia e conservação**: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento. 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010, p. 347-366.

ATKINSON, C. T. *Haemoproteus*. In: ATKISON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. **Parasitic disease of wild birds**. 1. Ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2008, p. 13- 28.

BAPTISTA, A. F. **Perfil parasitológico em frangos do campo**. 2010. 125 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação da Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2010.

BOWMAN, D. D. et al. **Georgis**: parasitologia veterinária. 9. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2010.

BRAGA, E. M.; BELO, N. O.; PINHEIRO, R. T. Técnicas para estudo de hemoparasitos em aves. In: MATTER, S. V. et al. **Ornitologia e conservação**: ciência aplicada e técnicas de pesquisa e levantamento. 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 398-411.

BRITO, A. S. A. et al. Endoparasites of wild birds from *campus* area and zoobotanical park, at the federal university of Acre, Rio Branco – Acre. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR,** Umuarama, v. 20, n. 3, p. 117-122, 2017.

BRUM, W. M. et al. Parasitismo em aves silvestres residentes e migratórias da Ilha da Marambaia, Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 36, n. 11, p. 1101-1108, 2016.

CAMPOS, M. F. F da. S. et al. Identificação parasitológica da cama de frangos reutilizada em uma granja avícola. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 25, n. 1, p. 27-30, 2018.

CARDONA, C. J.; IHEJINIKA, A.; BENETT, G. F. *Haemoproteus tophorthrix* infection in bobwhite quail. **Avian Disease,** Jacksonville, v. 46, n. 1, p. 249-255, 2002.

CARNEIRO, M. B.; CALAIS JÚNIOR, A. de.; MARTINS, I. V. F. Avaliação coproparasitológica e clínica de aves silvestres e exóticas mantidas em criatórios particulares no município de Alegre-ES. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 12, n. 3, p. 525-529, 2011.

CEOLIN, L. I. V. I.; LOVATO, M. Principais enfermidades infecciosas e parasitárias em perus. **Boletim informativo DMVP/UFSM**, Santa Maria, v. 6, n. 6, p. 12-16, 2012.

COELHO, H. E et al. Ocorrência de *Tetrameres* spp. em frango caipira *Gallus Domesticus*. **Pubvet**, Londrina, v. 5, n. 24, p. 1-6, 2011.

CONWAY, D. P.; MCKENZIE, M. E. **Poultry coccidiosis**: diagnostic and testing procedures. 3. ed. Ames: BlackWell Publishing, 2007.

COSTA, R. A. da. et al. Infecção natural por *Histomonas meleagridis* em pavões-indianos (*Pavo cristatus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 46, n. 333, p. 1-5, 2018.

COSTA, R. C. et al. Aspectos patológicos e parasitológicos da infecção por *Tanaisia (Paratanaisia) bragai* em pavões (*Pavo cristatus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 35, n. 5, p. 466-469, 2015.

DAHL, C. et al. The effect of concurrent infections with *Pasteurella multocida* and *Ascaridia galli* on free range chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 4, p. 313–324, 2002.

EHLERS, A. **Helmintos de mascotes exóticos – répteis e aves**. 2012. 72 f. Monografia (Graduação) – Trabalho apresentado como requisito parcial para graduação no curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

EMBRAPA. **Embrapa suínos e aves**. Elaborado por: ABPA, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>. Acesso em: 24 mai.2020.

ENOUT, A. M. J. et al. Parasitismo por malófagos (Insecta) e ácaros (Acari) em *Turdus leucomelas* (aves) nas estações reprodutiva e de muda de penas no Parque Estadual do Rio Preto, Minas Gerais, Brasil. **Zoologia**, Curitiba, v. 26, n. 3, p. 534–540, 2009.

FERREIRA, C. G. T.; BEZERRA, A. C. D. S.; AHID, S. M. M. Inquérito ectoparasitológico em galinhas caipiras, *Gallus gallus domesticus* L., do município de Apodi, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**, Juiz de Fora, v. 12, n. 3, p. 249-256, 2010.

FREITAS, F. L. C. et al. Aspectos clínicos e patológicos em frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) infectados experimentalmente com oocistos esporulados de *Eimeria acervulina* Tyzzer, 1929. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 16-20, 2008.

GOBLE, F. C.; KUTZ, H. L. The genus *Dispharynx* (Nematoda: Acuariidae) in galliform and passeriform birds. **The Journal of Parasitology**, London, v. 31, n. 5, p. 323-331, 1945.

GOLYNSKI, A. A**. Controle de helmintos de frangos de corte utilizando as plantas *Mentha piperita, Carapa guianensis, Artemisia absinthium e Chenopodium ambrosioides***. 2003. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programada de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2003.

GOMES, F. F. et al. Principais parasitos intestinais diagnosticados em galinhas domésticas criadas em regime extensivo na municipalidade de Campos dos Goytacazes, RJ. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 3, p. 818-822, 2009.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Editora Plêiade/FAPESP, 2001.

HARR, K. E. Clinical chemistry of companion avian species: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, Madson, v. 31, n. 3, p. 140-151, 2002.

KAP, M. et al. Histological assessment of PAX gene tissue fixation and stabilization reagents. **PLos One**, San Francisco, v. 6, n. 11, e27704, p. 1-10, 2011.

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA ANIMAL – HOVET-CCAE-UFES. Principais ectoparasitos e helmintos de aves domésticas. Ilustração em cores. Alegre, 24 set 2020.

MACHADO, A. C. R. M.; LIMA, O. M.; ARAÚJO, J. L. de. B. Helmintos parasitos em aves anseriformes que ocorrem em goiás. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 3, p. 185-198, 2006.

MANS, B. J.; GOTHE, R.; NEITZ, W. H. Biochemical perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. **Parasitology**, Cambridge, v. 129, n. 1, p. 95-111, 2004.

MARQUES, C. C. **Análise ecológica da helmintofauna do sábia-laranjeira *Turdus rufiventris* e do pardal *Passer domesticus* na região metropolitana de Porto Alegre, RS**. 2006. 288 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MARTINS, I. V. F. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. Vitória: EDUFES, 2019.

MATTIELLO, R. **Enfermedades parasitarias en aves de jaula.** Producción y tecnología de fauna acuática y terrestre. Argentina: UBA, 2011.

MATTOS, P. M. de.; ROSSATO, M. R.; ANTONUCCI, A. M. Principais parasitos em aves industriais (frangos, galinhas e perus) – revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Ingá, v. 32, ano XVI, 2019.

MCDOUGALD, L. R. Blackhead disease (histomoniasis) in poultry: a critical review. **Avian Diseases**, Athens, v. 49, n. 4, p. 462-476, 2005.

MEDIAVILLA, E. R. **Enfermedades de las aves**. 3. ed. México: Editorial Trillas, 2008.

MENEZES, R. C.; MATTOS JÚNIOR, D. G. de.; TORTELLY, R. Frequência e patologia· das infecções causadas por nematoides e cestoides em galinhas-d'angola (*Numida meleagris* Linnaeus, 1758) criadas extensivamente no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 35-39, 2001.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na medicina veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2010.

NICKOL, B. B. Phylum Acanthocephala. In: WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. **Fish diseases and disordens**: (protozoan and metazoan infections). 1. ed. Wallingford: CAB Internacional, 1995. 447-473 p.

NORTON, R. A.; RUFF, M. D. Nematodes and acanthocephalans. In: SAIF, Y. M. et al. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 931-961.

PADOVEZI, G. C. ***Haemoproteus* sp. e *Plasmodium* sp. em pombos domésticos (*Columba livia domestica*)**: revisão bibliográfica e relato de caso. 2010. 44 f. Monografia (Título de Pós-Graduada em Patologia Clínica Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Clínica Veterinária - Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2010.

PARRA, C. S. E. Trabajo experimental **- "Prevalencia de parasitos gastrointestinales en aves de combate (*Gallus gallus domesticus*)"**. 2019. 113 f. Trabajo de titulación previo a la obtención del título de médico veterinario zootecnista (carrera de medicina veterinaria y zootecnia**) -** Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca, Cuenca, 2019.

PATTI, J. F. T. W. Y. **Enfermedades de las aves**. 3. ed. Santafé de Bogotá: El Manual Moderno, 2002.

PENHA, G. A. Coccidiose aviária. **Revista Cientifica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, ano VI, n. 11, p. 1-5, 2008.

RENNÓ, P. P. et al. Endoparasitose em aves – revisão de literatura. **Revista Cientifica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, ano VI, n. 11, p. 1-6, 2008.

REVOLLEDO, L.; PIANTINO FERREIRA, A. J.; **Patologia aviária**. 1. ed. Brasil: Manole, 2008.

ROBERTS, L. S.; JANOVY, J. J.; NADLER, S. **Foundations of parasitology**. 9. ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2013.

SAIF, Y. M. et al. **Diseases of poultry**. 11. ed. USA: Iowa State Press, 2003.

SANTOS, H. F. dos. et al. **Doenças das aves**. 1. ed. Kentucky: Kindle, 2018.

SERRA-FREIRE, N. M.; MELLO, R. P. **Entomologia e acarologia na medicina veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2006.

SIQUEIRA, G. B. de.; MARQUES, S. M. T. Parasitos intestinais em galinhas caipiras da região metropolitana de Porto Alegre, RS. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Maringá, v. 10, n. 9, p. 690-695, 2016.

SNAK, A. et al. Análises coproparasitológicas de aves silvestres cativas. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 15, n. 4, p. 502-507, 2014.

SOARES, N. M. et al. Controle da infestação por *Ornithonyssus sylviarum* (Canestrini e Fanzago, 1877) (Acari: Macronyssidae) em poedeiras comerciais utilizando extrato de *Azadirachta indica*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 4, p. 175-178, 2008.

SOAVE, G. L. Anticoccidianos em rações - artigo 128. **Nutritime Revista Eletrônica**, UDESC, Santa Catarina, v. 8, n. 01, p. 1401-1417, 2011.

SOBRAL, F. E. S. **Eficácia anti-helmíntica da *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples (1983) e *Cucurbita pepo* L. sobre helmintos gastrintestinais de galinhas caipiras, *Gallus domesticus***. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2010.

SOULSBY, E. J. L. **Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated animals**. 7. ed. London: Baillière Tindall, 1982.

SOULSBY, E. J. L. **Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos:** en los animales domesticos. 7. ed. México: Nueva Editorial Interamericana, 1987.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary parasitology**. 4. ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2016.

THAPA, S. et al. Prevalence and magnitude of helminth infections in organic laying hens (*Gallus gallus domesticus*) across Europe. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 214, n. 1-2, p. 118-124, 2015.

TODD, W. T.; PLASSE, R.; ECKART, C. **Curassow husbandry: suggested protocol**. 2. ed. Houston: Houston Zoo Zoological Gardens, 1999.

TRAVASSOS, L. **Introdução ao estudo da helmintologia**. Rio de Janeiro: Edição da Revista Brasileira de Biologia,1950.

VALADÃO, M. C. **Helmintos parasitos gastrintestinais de *Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758 criados em sistema extensivo – identificação morfológica, molecular e controle biológico**. 2018. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.

VIEIRA, F. E. G. **Helmintofauna em frangos (*Gallus gallus domesticus, Linnaeus,* 1758) criados em sistema colonial/caipira na região norte do estado do paraná**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação, em Ciência Animal, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

VITA, G. F. **Eficácia dos princípios ativos da planta medicinal *Chenopodium ambrosioides* Linnaeus, 1786 (erva-de-santa-Maria), no controle de endoparasitos de *Gallus gallus* (galinha caipira) e *Coturnix japonica* (codorna japonesa)**. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

Avaliação ecocardiográfica da função atrial esquerda: importância e perspectivas em medicina veterinária

Franciely Mota de Oliveira[1]
Driéle Lutzke[2]
Caio Vaz Baqui Lima[3]
Débora de Souza Pozzatto[4]
Karina Preising Aptekmann[5]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: franciely.mvet@gmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: drielelutzke@gmail.com
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mvcaiobaqui@gmail.com
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: pozzatto.debora@hotmail.com
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: kapreising@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O átrio esquerdo (AE) desempenha funções fundamentais nos processos de sístole e diástole durante o ciclo cardíaco. A função atrial pode ser dividida em três fases específicas: fase de reservatório, fase de condução e fase de contração atrial. Cada uma destas fases do funcionamento atrial tem sido estudada na medicina e os resultados encontrados em estudos recentes têm auxiliado no diagnóstico e estadiamento das cardiopatias mais comuns, como fibrilação atrial, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e nos casos de insuficiência cardíaca congestiva e alterações congênitas (GALRINHO et al., 2009; HAVASI et al., 2017; TENEKECIOGLU et al., 2014).

A determinação da função atrial esquerda tem sido avaliada por meio de diferentes técnicas ecocardiográficas, como ecocardiografia bidimensional, tecnologia do *speckle tracking* e análise tridimensional. Ferramentas mais específicas, como tomografia computadorizada e ressonância magnética podem ser empregadas e são consideradas métodos padrão-ouro para determinação da função atrial esquerda, entretanto, necessitam de equipamentos específicos, de custo elevado, além de requerer anestesia do paciente, o que inviabiliza sua utilização na rotina clínica (STEFANADIS; DERNELLIS; TOUTOUZAS, 2001).

Assim como na medicina, a avaliação da função do AE tornou-se um importante componente na avaliação de diversas cardiopatias na veterinária, como as arritmias atriais, insuficiência cardíaca e doença valvar crônica de mitral (DVCM), fornecendo substrato para diagnósticos mais precisos (FRANCO et al., 2016; MATSUMOTO et al., 2014). O objetivo desta revisão foi apresentar métodos mais acurados na avaliação de sobrecargas atriais esquerdas e que são possíveis de serem utilizados na rotina clínica veterinária.

2 ÁTRIO ESQUERDO

O AE atua como um reservatório durante a fase de sístole ventricular no início da diástole, permitindo a comunicação e a passagem do sangue das veias pulmonares até o ventrículo esquerdo (VE). Além disso, no final da diástole, essa câmara também se comporta de forma ativa e contrátil. Neste momento, o AE expõe-se diretamente às pressões do VE por meio da abertura da valva mitral, sofrendo influência de múltiplos fatores responsáveis pelo enchimento ventricular, desta forma o AE constitui-se em um parâmetro estável que reflete a duração e a severidade da disfunção ventricular (ABHAYARATNA et al., 2006).

Por esse motivo, a dimensão do AE tem sido estudada como potente preditor de eventos adversos em diversas situações clínicas, como no acidente vascular cerebral isquêmico, na fibrilação atrial, alterações congênitas, falência do VE, regurgitação de mitral e disfunção diastólica ventricular (GALRINHO et al., 2009; HAVASI et al., 2017; SOUZA, 2006; TENEKECIOGLU et al., 2014).

2.1 FISIOLOGIA

A função mecânica atrial esquerda é caracterizada por três fases durante o ciclo cardíaco. A primeira fase é a de reservatório, que corresponde ao momento em que o AE armazena em seu interior o sangue procedente das veias pulmonares. Esta etapa acontece na sístole ventricular e diástole atrial. Sofre influência da contração e relaxamento atrial, contração do VE que desloca o anel mitral no sentido caudal, complacência da câmara atrial e sístole ventricular direita, que exerce influência no fluxo das veias pulmonares. Estima-se que 42% do volume sistólico do VE estejam armazenados no AE durante a sístole ventricular, ressaltando a importância da função de reservatório do AE no débito cardíaco (GRANT; BUNNELL; GREENE, 1964; STEFANADIS; DERNELLIS; TOUTOUZAS, 2001).

A segunda, a fase de conduto, refere-se ao momento de abertura da valva mitral que permite a passagem de sangue de forma passiva do átrio para o VE, no início da diástole. Com a valva mitral aberta, o sangue armazenado no AE durante a fase de reservatório flui para o VE. Ao mesmo tempo, o sangue oriundo das veias pulmonares entra para o AE, sem alterar o volume atrial, e praticamente escoa para o VE através da abertura da valva mitral. Este volume não é atribuído a função de reservatório ou à contração atrial e caracteriza a função de conduto do AE. Essa fase não possui gasto de energia e ocorre antes da contração atrial (HOIT et al., 1993; PAGEL et al., 2003).

A terceira fase equivale ao período de contração atrial, na qual o preenchimento final do VE é obtido com gasto de energia, também denominada fase de bomba ou contração atrial ativa. Representa 15 a 30 % do enchimento ventricular esquerdo no final da diástole. É importante ressaltar que a avaliação da função sistólica atrial, mensurada pelas medidas volumétricas sofre influência de diversos fatores, como pré-carga, pós-carga, tempo de contração atrial e estímulo vagal, portanto não deve ser utilizada rigorosamente como índice do estado inotrópico da câmara atrial esquerda (HOIT et al., 1993; MATSUMOTO et al., 2014; PAGEL et al., 2003).

Estas fases são responsáveis por contribuir para o enchimento ventricular esquerdo adequado, bem como o desempenho cardiovascular. Assim, um aumento no tamanho do AE, pode resultar numa função atrial prejudicada (CAIVANO et al., 2016). Além disso, alterações estruturais, elétricas e iônicas, além de interferirem na função atrial, aumentam a susceptibilidade de arritmias, sendo a função atrial altamente relevante para a resposta terapêutica na fibrilação atrial (GOETTE et al., 2017).

3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ATRIAL ESQUERDA

Existem diferentes técnicas de imagem que permitem avaliar o volume atrial esquerdo. Dentre os métodos não invasivos, a ecocardiografia transtorácica bidimensional é o método usualmente empregado, entretanto pode ser feito por meio da ecocardiografia tridimensional, tomografia computadorizada e ressonância magnética. As técnicas de avaliação invasiva, tais como cateterização retrógrada do AE, relação área-pressão atrial esquerda e elastância atrial esquerda, são mais acuradas, entretanto, necessitam de materiais adequados, e anestesia do paciente, o que inviabiliza sua utilização rotineira (STEFANADIS; DERNELLIS; TOUTOUZAS, 2001).

3.1 ECOCARDIOGRAFIA TRANSTORÁCICA BIDIMENSIONAL

Na avaliação ecocardiográfica bidimensional, o diâmetro ântero-posterior avaliado no modo monodimensional (modo M) e relação AE/aorta no modo bidimensional (modo B), não representam adequadamente a verdadeira dimensão do AE, já que a câmara atrial esquerda não apresenta uma estrutura simétrica e sim, tridimensional. Além disso, a dilatação atrial não ocorre de modo uniforme, apresentando variações quanto a sua forma e tamanho. Por estas razões, a Sociedade Americana de Ecocardiografia e a Sociedade Europeia de Ecocardiografia recomendam a medida do volume atrial avaliado pelo método de Simpson nas janelas apicais de 4 e 2 câmaras (BLUME et al., 2011; FRANCO et al., 2016; LANG et al., 2015).

A técnica de Simpson, avaliada pelo método de discos, considera o volume de uma figura, por meio da soma de volumes referentes as partes menores e semelhantes. Desta forma, não comprometem os valores obtidos em virtude das alterações geométricas do AE (variações de formato e dilatação atrial) (BOON, 2011; FRANCO et al., 2016). Este método permite a avaliação de todos os volumes do AE, conforme demonstrado na Figura 1. O volume pré-contração atrial é medido no início da onda P no eletrocardiograma. O volume mínimo do AE

é avaliado no fechamento da valva mitral no final da diástole. E por fim, o volume máximo do AE, medido imediatamente antes da abertura da valva mitral, no final da sístole ventricular. Por meio dessas medidas volumétricas, obtém-se algumas variáveis relacionadas às diferentes fases da função atrial (TABELA 1) (SOUSA, 2017).

Figura 1 – Medidas volumétricas do átrio esquerdo pelo método de Simpson: volume pré-contração atrial (A); volume mínimo do AE (B); volume máximo do AE (C).
Fonte: Sousa (2017).

Tabela 1 – Avaliação da função atrial esquerda pela análise volumétrica. - Legenda: Vol máx – volume máximo do átrio esquerdo; vol pré P – volume do átrio esquerdo medido no início da onda P no eletrocardiograma; vol mín – volume mínimo do átrio esquerdo; VSVE – volume sistólico do ventrículo esquerdo.

Função do AE	Fórmula
Função de reservatório	
Volume total de esvaziamento	Vol máx - vol mín
Função total de esvaziamento	(Vol máx - vol mín) / vol máx
Função de conduto	
Volume de esvaziamento passivo	Vol máx - vol pré P
Fração de esvaziamento passivo	(Vol máx - vol pré P) / vol máx
Volume de conduto	VSVE - (vol máx - vol mín)
Função ativa	
Volume de esvaziamento ativo	Vol pré P - vol mín
Fração de esvaziamento ativo	(Vol pré P - vol mín) vol pré P

Fonte: Sousa (2017).

Na medicina, estudos comprovam maior precisão deste método na avaliação de pacientes com DVCM quando comparado com a avaliação do diâmetro ântero-posterior e relação AE/aorta (TANI et al., 2004; TSANG et al., 2001; TSANG et al., 2002). Porém, na medicina veterinária a relação AE/aorta ainda é utilizada, mesmo que subjetivamente, no estadiamento da insuficiência cardíaca congestiva em cães com DVCM (KEENE et al., 2019).

Em um estudo comparativo entre os métodos de Simpson e a relação AE/aorta em cães com DVCM e cães saudáveis, verificou-se que métodos baseados em volume reproduzem

resultados mais fidedignos, com menor variação intra e inter-observador, sendo a avaliação pelo método Simpson superior à relação AE/aorta (HÖLLMER et al., 2016).

Os valores de referência, para cães, do volume atrial esquerdo, em sístole e diástole, avaliado pelo método de Simpson, já foram determinados em cães saudáveis e em cães com DVCM. Sendo que animais doentes, apresentaram volumes atriais maiores que animais sadios, bem como animais em estágio mais avançado da doença (estágio C) quando comparado com os estágios iniciais (B1, B2). Além disso, verificou-se que a mensuração deste método pela janela paraesternal esquerda, apresentou valores com menor desvio padrão do que quando realizado pela janela paraesternal direita, demonstrando ser uma avaliação mais fidedigna e com valores mais uniformes (FRANCO et al., 2016).

Outro parâmetro avaliado pela ecocardiografia bidimensional foi a fração de encurtamento do AE. Este parâmetro é mensurado no modo M, guiado pela imagem paraesternal direita, utilizada para medição da relação AE/aorta, e demonstrou ser um importante índice da função atrial esquerda na avaliação de gatos saudáveis e com cardiomiopatia hipertrófica (ABBOTT; MACLEAN, 2006; FUENTES et al., 2020).

3.2 *SPECKLE TRACKING*

Com o objetivo de aprimorar os resultados obtidos na ecocardiografia bidimensional e tridimensional, novas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a sensibilidade do exame na avaliação da função atrial esquerda. A tecnologia do *speckle tracking* (rastreamento de pontos) permite detectar de maneira precoce disfunções atriais esquerdas nas mais diversas cardiopatias por meio do estudo da deformação atrial, apresentando índices mais sensíveis do que na ecocardiografia bidimensional convencional (ABDUCH et al., 2014; RIMBAS; DULGHERU; VINEREANU, 2015).

É uma ferramenta ecocardiográfica não invasiva que possibilita a avaliação quantitativa da função miocárdica regional e global, independente do ângulo de insonação do ultrassom, permitindo assim a avaliação da mecânica cardíaca nos três planos espaciais: longitudinal, circunferencial e radial (ABDUCH et al., 2014; BLESSBERGER; BINDER, 2010; CHETBOUL, 2010). A análise de deformação miocárdica (*strain*) e da taxa de deformação miocárdica (*strain rate*) é objeto de vários estudos científicos que descrevem a mecânica miocárdica (HAVASI et al., 2017; SARAIVA et al., 2010; TOALDO et al., 2017).

Esta técnica incorpora ao ecocardiograma bidimensional, a captura e rastreamento de pontos, gerando vetores de movimento e curvas de deformação ao longo do ciclo cardíaco. Os

speckles, também chamados marcas acústicas digitais, aparecem como pequenos pontos brilhantes dentro do miocárdio e representam marcadores acústicos teciduais naturais. Cada marca digital é formada por um pequeno conjunto de imagens em escala cinza, cuja disposição é única e caracteriza uma porção particular do miocárdio, chamada de padrão de rastreamento (*speckle pattern*) (DEL CASTILLO; HERSZKOWICZ; FERREIRA, 2010).

Devido a sua relativa estabilidade temporal, os *speckles* podem ser monitorados a cada momento durante todo o ciclo cardíaco, promovendo a análise da função sistólica e diastólica. São capturados pelo sistema de análise, a partir da imagem bidimensional preto e branco, de forma individual ou em grupos, e seguidas quadro a quadro durante o ciclo cardíaco. Esse deslocamento dos *speckles* formam ciclos de movimento, gerando um loop, que apresentam mudanças instantâneas de direção e velocidade. Essas mudanças podem ser representadas por vetores (FIGURA 2), cuja direção e magnitude podem indicar a deformação (*strain*) e a velocidade da taxa de deformação (*strain rate*) dos diferentes segmentos miocárdicos (ABDUCH et al., 2014; CAIVANO et al., 2016; DEL CASTILLO; HERSZKOWICZ; FERREIRA, 2010).

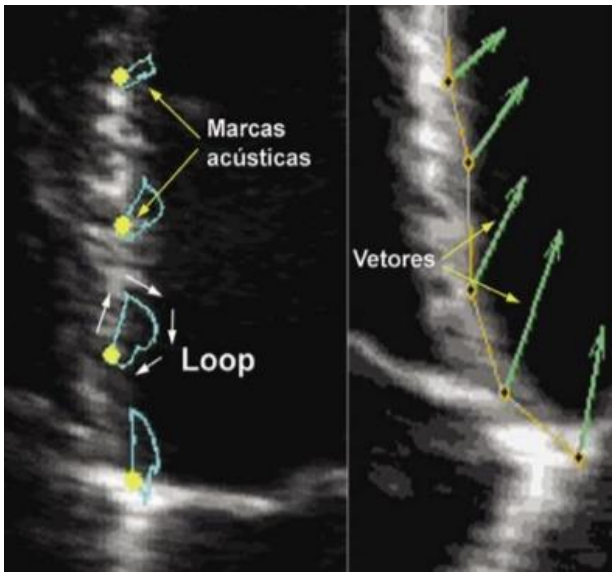

Figura 2 – Esquema das marcas acústicas e sua movimentação em forma de loop. À direita, vetores gerados pela movimentação das marcas acústicas. Estes vetores mudam de amplitude e direção ao longo do ciclo cardíaco constantemente.
Fonte: Del Castillo, Herszkowicz e Ferreira (2010).

Para avaliação da deformação atrial (*strain*), o *speckle tracking* é realizado utilizando o ciclo ventricular como ponto de referência, representado pelo início do complexo QRS no eletrocardiograma. O gráfico gerado equivale a duas curvas de pico positivo de *strain* longitudinal, sendo que a primeira refere-se à fase de reservatório e a segunda corresponde à

fase de contração atrial, e pela subtração desses dois picos obtêm-se o *strain* na fase de condução (FIGURA 3) (VIEIRA et al., 2014).

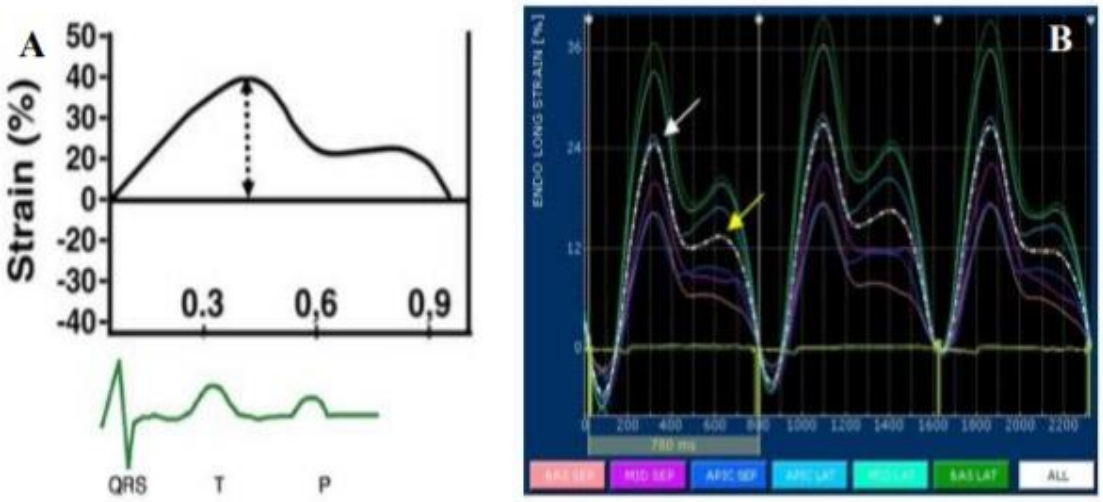

Figura 3 – A: Desenho esquemático representativo da curva de *strain* atrial pelo método QRS utilizando a técnica *speckle tracking*. B: Gráfico demonstrativo das curvas de *strain* atrial dos 6 segmentos avaliados (linhas coloridas) por meio do *speckle tracking*. A linha branca refere-se a média dos segmentos (*strain* global). A seta branca corresponde a fase de reservatório do átrio esquerdo (AE) e a seta amarela representa a fase de contração atrial.
Fonte: A - Mor-Avi et al. (2011); B - Coelho et al. (2018).

Para avaliação do *strain rate* longitudinal, o *software* reproduz automaticamente um gráfico com três curvas. A fase de reservatório é representada pela primeira curva de pico positivo, enquanto que a fase de condução e contração correspondem as outras duas curvas de pico negativo, respectivamente (FIGURA 4) (COELHO et al., 2018).

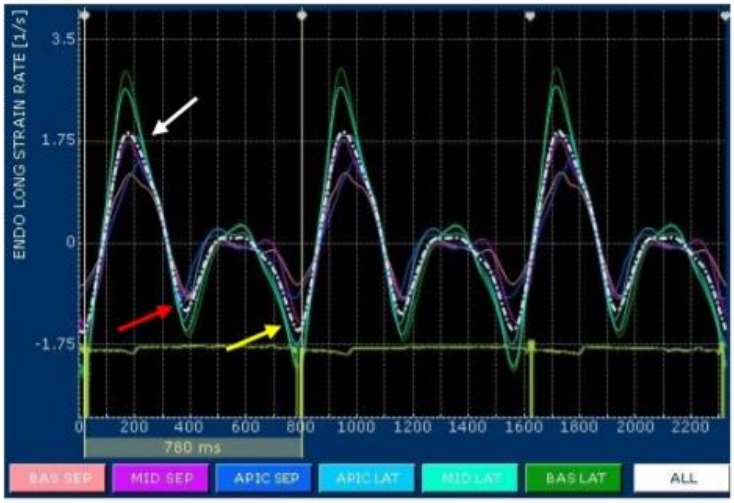

Figura 4 – Gráfico demonstrando curvas de *strain rate* atrial dos 6 segmentos avaliados (linhas coloridas) por meio da técnica *speckle tracking*. A linha branca representa a média dos segmentos. A fase de reservatório do átrio esquerdo (AE) é representada pela seta branca, a seta vermelha corresponde a fase de condução e a seta amarela a fase de contração atrial.
Fonte: Coelho et al. (2018).

Na medicina veterinária, o primeiro estudo utilizando a técnica *speckle Tracking* na avaliação da função atrial esquerda, foi realizado em cães diagnosticados com DVCM, constando que o tamanho e função do AE atuam como prognóstico da doença (NAKAMURA et al., 2014). Mais tarde, outros estudos foram realizados comprovando a ocorrência de um declínio progressivo da função atrial esquerda com a progressão da doença (NAKAMURA et al., 2017; TOALDO et al., 2017).

Na DVCM, observa-se diminuição na capacidade de reservatório do AE com o avanço da doença, que pode ser explicado pela hipertrofia, alterações inflamatórias crônicas e fibrose dos miócitos, tal como observado em pessoas (CAMELI et al., 2011; NAKAMURA et al., 2014). Apesar disso, a fase ativa de contração atrial foi a mais afetada com a progressão da DVCM, decorrente principalmente da diminuição da contratilidade do AE (NAKAMURA et al., 2014). Outros fatores que podem influenciar nas fases de função do AE são a faixa etária dos animais, como observado em cães saudáveis (CAIVANO et al., 2016); e a pré-carga, como relatado em cães sadios após infusão de ringer lactato (OSUGA et al., 2016).

Apesar deste método de avaliação ser mais minucioso, permitindo uma análise mais sensível de cada parte do miocárdio, também expressa algumas limitações. Os *softwares* são designados para exame do VE, podendo abrir um viés nas mensurações da função atrial esquerda. Outras limitações são a demora na aquisição e processamento das imagens de alta qualidade, escassez de valores normais, estudos realizados com poucos indivíduos e variabilidade nos valores entre os diferentes algoritmos usados para realizar as mensurações (HOIT, 2014; NAKAMURA et al., 2017; TOALDO et al., 2017). Além disso, uma outra restrição na avaliação da função do AE é o fato que, ao contrário da função ventricular, há poucos estudos comparando os dados obtidos com a sonomicrometria ou ressonância magnética, sendo estas últimas consideradas padrão ouro na medicina, para se obter a função miocárdica (SARAIVA et al., 2010; TOALDO et al., 2017).

3.3 ECOCARDIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL

A ecocardiografia tridimensional é uma técnica que permite mensuração de volumes com maior precisão, além de proporcionar imagens mais anatômicas, facilitando o diagnóstico das afecções cardíacas. É realizada da mesma forma que o exame transtorácico convencional, porém com utilização de transdutor e *softwares* específicos de última geração, que permitem a reconstrução tridimensional da imagem. A avaliação do volume por meio dessa técnica é obtida através da reconstrução digital da cavidade atrial usando como referência pontos anatômicos

distintos (FIGURA 5), diferente da ecocardiografia bidimensional que utiliza cálculos geométricos pré-determinados, e tornando-se o método capaz de gerar resultados mais fidedignos, uma vez que a variação interobservador é minimizada (PICARD; POOP; WEYMAN, 2008).

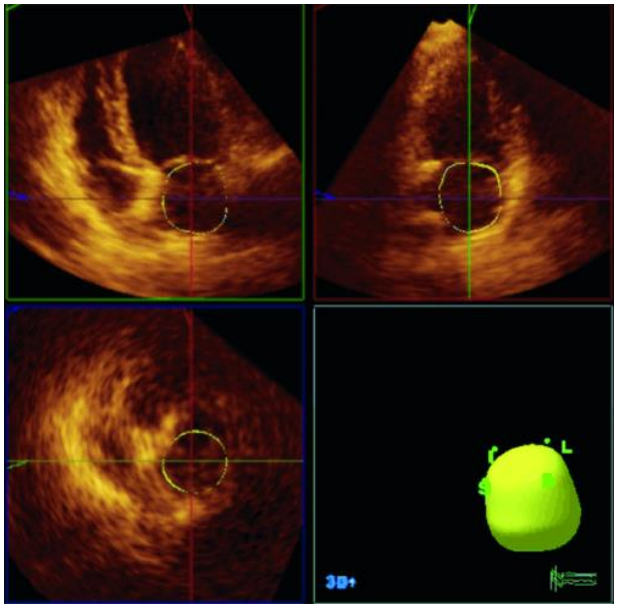

Figura 5 – Imagem tridimensional em tempo real do volume do átrio esquerdo (AE) na diástole final do átrio em um cão normal. Após a definição manual de 5 pontos de referência, a borda endocárdica foi automaticamente traçada e editada manualmente quando necessário, para criar um molde (em amarelo) da cavidade do AE.
Fonte: Tjdholm et al. (2011).

O uso desta modalidade na avaliação da função atrial esquerda permite identificar a presença de alterações em cada uma das fases atriais. Por mensurar uma dimensão a mais que a técnica bidimensional, a utilização desta técnica ecocardiográfica demonstrou melhor análise da função atrial, conforme observado em estudos utilizando cães saudáveis e portadores de DVCM (BOUVARD et al., 2019; LEBLANC; SCOLLAN; SISSON, 2016; TJDHOLM et al., 2011). Entretanto, apesar de oferecer resultados superiores, ainda não é o método mais usual na rotina clínica, visto que sua realização requer equipamento específico e de alto custo (HOTTA et al., 2011; TJDHOLM et al., 2011).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por ser uma técnica não invasiva e possibilitar a detecção precoce de muitas doenças cardíacas, a ecocardiografia pode ser considerada um dos métodos diagnósticos mais importantes na cardiologia. As novas ferramentas diagnósticas como *speckle tracking* e

ecocardiografia tridimensional, têm sido empregadas com êxito na avaliação da função atrial na medicina, aumentando a capacidade diagnóstica do exame em pacientes humanos. No entanto, na medicina veterinária o uso dessas técnicas ainda é recente. Desta forma, mais estudos são necessários explorando essas novas ferramentas na rotina clínica veterinária, para estabelecimento de prognóstico das cardiopatias, bem como para auxílio do clínico no tratamento precoce dessas doenças.

5 REFERÊNCIAS

ABBOTT, J. A.; MACLEAN, H. N. Two-dimensional echocardiographic assessment of the feline left atrium. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 20, p. 111-119, 2006.

ABDUCH, M. C. D. et al. Estudo da mecânica cardíaca pelo speckle tracking. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 4, p. 403-414, 2014.

ABHAYARATNA, W. P. et al. Left atrial size: physiologic determinants and clinical applications. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 47, p. 2357-2363, 2006.

BLESSBERGER, H.; BINDER, T. Non-invasive imaging: two dimensional speckle tracking echocardiography-basic principles. **Heart**, London, v. 96, n. 9, p. 716-722, 2010.

BLUME, G. G. et al. Left atrial function : physiology, assessment, and clinical implications. **European Journal of Echocardiography**, London, v. 12, p. 421-430, 2011.
BOON, J. A. **Veterinary echocardiography**. 2. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2011.

BOUVARD, J. et al. Assessment of left atrial volume in dogs: comparisons of two-dimensional and real-time three-dimensional echocardiography with ECG-gated multidetector computed tomography angiography. **Journal of Veterinary Cardiology**, Amsterdam, v. 24, p. 64-77, 2019.

CAIVANO, D. et al. Left atrial deformation and phasic function determined by 2-dimensional speckle tracking echocardiography in healthy dogs. **Journal of Veterinary Cardiology**, Amsterdam, v. 18, p. 146-155, 2016.

CAMELI, M. et al. Chronic mitral regurgitation: left atrial deformation analysis by two-dimensional speckle tracking echocardiography. **Echocardiography**, Armonk, v. 28, p. 327-334, 2011.

CHETBOUL, V. Advanced techniques in echocardiography in small animals. **Journal of Veterinary Cardiology**, Amsterdam, v. 40, n. 4, p. 529-543, 2010.

COELHO, M. R. et al. Assessment of left atrial function in dogs with myxomatous mitral valve disease by biplane simpson’s method. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**

Zootecnia, Belo Horizonte, v. 70, n. 5, p. 1349-1354, 2018.

DEL CASTILLO, J. M.; HERSZKOWICZ, N.; FERREIRA, C. Speckle tracking – a contratilidade miocárdica em sintonia fina. **Revista Brasileira de Ecocardiografia e Imagem Cardiovascular**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 46-54, 2010.

FRANCO, R. P. et al. Determination of left atrial volume in healthy dogs and dogs with myxomatous mitral valve disease. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 743-748, 2016.

FUENTES, V. L. et al. ACVIM consensus statement guidelines for the classification, diagnosis, and management of cardiomyopathies in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 34, p. 1062-1077, 2020.

GALRINHO, A. et al. Volume da aurícula esquerda: um "velho" cálculo ecocardiográfico com uma importância prognóstica renovada. Um estudo em doentes com miocardiopatia dilatada. **Revista Portuguesa Cardiologia**, Lisboa, n. 10, v. 28, p. 1049-1060, 2009.

GOETTE, A. et al. EHRA/HRS/APHRS/SOLAECE expert consensus on atrial cardiomyopathies: definition, characterization, and clinical implication. **Heart Rhythm**, New York, v. 14, n. 1, p. 30-40, 2017.

GRANT, C.; BUNNELL, I. L.; GREENE, D. G. The reservoir function of the left atrium during ventricular systole. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 37, p. 36-43, 1964.

HAVASI, K. et al. Análise por *speckle-tracking* com ecocardiografia 3D da deformação de AE em pacientes com tetralogia de Fallot corrigida. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 108, n. 2, p. 129-134, 2017.

HOIT, B. D. Left atrial size and function: role in prognosis. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 63, n. 6, p. 493-505, 2014.

HOIT, B. D. et al. Influence of pericardium on left atrial compliance and pulmonar venous flow. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 264, n. 6, p. 1781-17187, 1993.

HÖLLMER, M. et al. Comparison of four echocardiographic methods to determine left atrial size in dogs. **Journal of Veterinary Cardiology**, Amsterdam, v. 18, p. 137-145, 2016.

HOTTA, V. T. et al. Comparison between 2D and 3D Echocardiography in the evaluation of reverse remodeling after CRT. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 97, p. 111–121, 2011.

KEENE, B. W. et al. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 33, n. 3, p. 1127-1140, 2019.

LANG, R. M. et al. Recommendations for cardiac chambre quantification by echocardiography in adults: an from the American society of echocardiography and the

European association of cardiovascular imaging. **European Heart Journal Cardiovascular Imaging**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 233-270, 2015.

LEBLANC, N.; SCOLLAN, K.; SISSON, D. Quantitative evaluation of left atrial volume and function by one-dimensional, echocardiography in a population of normal dogs. **Journal of Veterinary Cardiology**, Amsterdam, v. 18, p. 336-349, 2016.

MATSUMOTO, A. Y. et al. Artigo de revisão avaliação ecocardiográfica da função atrial esquerda: aspectos fisiológicos e clínicos artigo de revisão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 27, p. 87-96, 2014.

MOR-AVI, V. et al. Current and evolving echocardiographic techniques for the quantitative evaluation of cardiac mechanics: ASE/EAE consensus statement on methodology and indications endoserd by the Japanese society of echocardiogragphy. **European Journal of Echocardiography**, London, v. 12, n. 3, p. 167-205, 2011.

NAKAMURA, K. et al. Left atrial strain at different stages of myxomatous mitral valve disease in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 31, p. 316-325, 2017.

NAKAMURA, K. et al. Prognostic value of left atrial function in dogs with chronic mitral valvular heart disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 28, p. 1746-1752, 2014.

OSUGA, T. et al. Effects of experimental cardiac volume loading on left atrial phasic function in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 77, p. 952-960, 2016.

PAGEL, P. S. et al. Mechanical function of the left atrium: new insights based on analysis of pressure-volume relations and Doppler echocardiography. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 98, n. 4, p. 975-994, 2003.

PICARD, M. H.; POPP, R. L.; WEYMAN, A. E. Assessment of left ventricular function by echocardiography: a technique in evolution. **Journal of the American Society of Echocardiography**, St. Louis, v. 21, p. 14-21, 2008.

RIMBAS, R. C.; DULGHERU, R. E.; VINEREANU, D. Lacunas Metodológicas na avaliação da função do átrio esquerdo por ecocardiografia bidimensional com *speckle tracking*. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 105, p. 625-636, 2015.

SARAIVA, R. M. et al. Left atrial strain measured by two-dimensional speckle tracking represents a new tool to evaluate left atrial function. **Journal of the American Society of Echocardiography**, St. Louis, v. 23, p. 172-180, 2010.

SOUSA, F. T. T de. **Avaliação ecocardiográfica da função do átrio esquerdo como marcadora de eventos em pacientes com insuficiência cardíaca**. 2017. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SOUZA, A. C. S. Volume atrial esquerdo como índice de função diastólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 86, n. 3, p. 27-33, 2006.

STEFANADIS, C.; DERNELLIS, J.; TOUTOUZAS, P. A clinical appraisal of left atrial function. **European Heart Journal**, London, v. 22, p. 22-36, 2001.

TANI, T. et al. Left atrial volume and the risk of paroxysmal atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. **Journal American Society Echocardiography**, St. Louis, v. 17, n. 6, p. 644-648, 2004.

TENEKECIOGLU, E. et al. Função atrial esquerda prejudicada associada com a fibrilação atrial paroxística na hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 102, n. 3, p. 253-262, 2014.

TJDHOLM, A. et al. Comparisons of 2 - and 3 - dimensional echocardiographic methods for estimation of left atrial size in dogs with and without myxomatous mitral valve disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 25, n. 6, p. 1320-1327, 2011.

TOALDO, M. B. et al. Assessment of left atrial deformation and function by 2-dimensional speckle tracking echocardiography in healthy dogs and dogs with myxomatous mitral valve disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 31, p. 641-649, 2017.

TSANG, T. S. M. et al. Left atrial volume: important risk marker of incident atrial fibrillation in 1655 older men and women. **Mayo Clinic Proceeding**, Philadelphia, v. 76, n. 5, p. 467-475, 2001.

TSANG, T. S. M. et al. Left atrial volume as a morphysiologic expression of left ventricular diastolic dysfunction and relation to cardiovascular risk. **The American Journal of Cardiology**, Philadelphia, v. 90, n. 12, p. 1294-1299, 2002.

VIEIRA, M. J. et al. Left atrial mechanics: echocardiographic assessment and clinical implications. **Journal of the American Society of Echocardiography**, St. Louis, v. 27, n. 5, p. 463-478, 2014.

Mutação MDR1-1Δ e glicoproteína-P: importância na clínica de animais de companhia

Lucas Dewilliam Paixão de Vasconcelos[1]
Amanda Maria Miranda Rodrigues dos Santos[2]
Leonardo Oliveira Trivilin[3]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lucas-d-vasconcelos@hotmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: amanda_mmrs@hotmail.com
[3] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: leotrivilin@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Com o advento da farmacogenética, uma ciência que estuda a variabilidade genética individual a fim de aspirar uma resposta terapêutica, foi possível determinar o impacto que alterações em genes importantes para a farmacocinética e farmacodinâmica possuem na terapêutica médico veterinária (SHI; BLEAVINS; FELIX, 2001).

Dentre os vários genes estudados está o MDR1 ou ABCB1, responsável por expressar a glicoproteína P (gp-P), a qual está envolvida nos processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção de muitos fármacos nos organismos vivos, humanos e animais (AMBUDKAR et al., 2003; LINARDI; NATALINI, 2006).

O gene MDR1 pode apresentar deleção de quatro pares de base na região codificadora, conhecido como MDR1-1Δ, que culmina na parada precoce da síntese de gp-P (MEALEY, 2004). Nos animais esse problema ocorre principalmente nos cães, em algumas raças-específicas. Inicialmente, achava-se que essa mutação estava restrita a cães de pastoreio, como Collie, Boder Collie, Pastor Australiano, Shetland Sheepdog e ao Old English Sheepdog. No entanto, com vários estudos na área, foram diagnosticadas outras raças portadoras da mutação, como por exemplo Whippet, Pastor Suiço, McNab, podendo haver em cães de raças misturadas (no Brasil, conhecido como SRDs) e várias outras raças (DONNER et al., 2016; GEYER et al., 2005a; GEYER et al., 2007; GRAMER et al., 2011; MEALEY et al., 2001; NEFF et al., 2004; NELSON et al., 2003).

A mutação MDR1-1Δ leva à resistência a múltiplas drogas, por subexpressão da gp-P, o que gera maior suscetibilidade à intoxicação por fármacos substratos da mesma, como por exemplo, a ivermectina (EADIE; HUGHES; WHITE, 2014; MEALEY; MEURS, 2008). Porém, outros importantes fármacos foram descritos como substratos de gp-P, como loperamida, acepromazina, milbemicina, dentre outras (DESHPANDE et al., 2016; EADIE; HUGHES; WHITE, 2014; FROMM, 2002; KERB, 2006; MEALEY et al., 2008).

O uso desses fármacos em animais portadores de MDR1-1Δ pode levar à intoxicação, cujos sinais clínicos vão de tremores, midríase e salivação, à alguns sinais graves de neurotoxicidade, como depressão, desorientação, coma e morte (FECHT et al., 2007; GEYER et al., 2005a; GEYER; JANKO, 2012).

Felizmente, com os conhecimentos adquiridos hoje por meio da biologia molecular, é possível determinar o *status* genético do animal para a deleção em MDR1, classificando-o como

portador do gene mutante ou selvagem, e esse avanço foi um dos primeiros passos para anexar os conhecimentos de farmacogenética na clínica veterinária em geral (MEALEY, 2004).

2 GENE ABCB1 OU MDR1 E SUA MUTAÇÃO DE DELEÇÃO

O gene ABCB1, também conhecido como MDR1, está presente no cromossoma 14 canino, e em humanos está presente no cromossomo 7 (ZALCBERG et al., 1994). É um gene que codifica uma importante proteína transportadora, a glicoproteína-P. Além disso, esse gene pode apresentar uma importante mutação de deleção de quatro pares de bases (MDR1-1Δ), gerando assim, códons de parada da região codificadora da síntese de glicoproteína-P no indivíduo (GEYER et al., 2005b; MEALEY et al., 2001; NEFF et al., 2004; ROULET et al., 2003).

Importante ressaltar que cães homozigotos podem apresentar dois genótipos: o normal, também conhecido como selvagem (MDR1 +/+) e que não passam a mutação a diante, ou o mutante (MDR1 -/-), cujos animais portadores apresentam sensibilidade à algumas classes de medicamentos e risco de intoxicação. Outro genótipo observado é o heterozigoto (MDR1 +/-), cujos animais que o apresentam são conhecidos como portadores, e podem se intoxicar em menor grau ou apresentar reações adversas em doses mais altas, com 50% de chance de passar seu gene a sua prole (BISSONNETTE et al., 2009).

Assim, para determinar os cães portadores da mutação e evitar que outras raças adicionais sejam expostas ao risco e, consequentemente, sensibilidade a vários princípios ativos, são realizadas pesquisas com populações caninas de várias raças, com base na filogenia e parentesco com Collie, bem como fenótipo de sensibilidade medicamentosa (NEFF et al., 2004).

2.1 HISTÓRIA DA MUTAÇÃO MDR1-1Δ

A história da distribuição da mutação MDR1-1Δ foi descrita na revisão de Neff et al. (2004), e essa é a única publicação que remonta o caminho para desvendar o surgimento da mutação na espécie canina. Portanto, todas as informações aqui transcritas são baseadas nessa publicação.

Foi descrito que o animal precursor da mutação de deleção em MDR1 (MDR1-1Δ) viveu na Grã-Bretanha em 1800, antes do aparecimento das raças que hoje conhecemos, porém, antes

de 1870, não existiam relatos de registros determinando raças especificas de cães de pastoreio, somente algumas variações locais, que trabalhavam conduzindo ovelhas, por exemplo, e após foram adaptados a cada local e ao trabalho exercido (NEFF et al., 2004).

A industrialização no século XIX trouxe mudanças no comércio e transporte, o que pode ter ajudado a definir algumas raças por meio do cruzamento entre os animais trabalhadores existentes na época. Além disso, o sucesso de campeonatos chamados de "teste de campo", fez com que algumas raças se destacassem, enquanto outras, como Galway Collie, Dalesman, Manx Sheepdog e Welsh Gray começassem a desaparecer. Assim, mudanças sociais e econômicas geradas na época alteram o papel dos cães na sociedade, o que culminou com o surgimento das primeiras raças formais, provenientes do trabalho de pastoreio, sendo eles os Collie, Old English Sheepdog e o Shetland Sheepdog, e surgiram criadores de raças como Collie, Old Cockie e Trefoil, na década de 1860 (NEFF et al., 2004).

Relatos na Grã-Bretanha do século 19 descrevem pastores utilizando duas raças complementares de cão: a primeira de Collies menores - excelentes pastores; e a segunda uma raça de cão maior e mais versátil chamada de "tipo inglês antigo", cujas habilidades permeavam a direção, proteção e reunião dos rebanhos. Dessa forma, os ancestrais que produziram MDR1-1Δ eram cães de trabalho de pastoreio e que também fazem parte da ancestralidade de raças como Australian Shepherd, English Shepherd e McNab, mesmo sendo essas raças desenvolvidas na América do Norte nos anos 1900 (NEFF et al., 2004).

Relatos sugerem que a mutação MDR1-1Δ antecedeu o registro formal e estabelecimento de raças britânicas a partir de 1873. No entanto, as estimativas da idade do alelo mutante evidenciam que o mesmo não é antigo. Uma vez que está ligado à linhagem Collie que surgiu após a introdução de cães romanos e vikings que contribuíram para o surgimento das raças inglesas (FIGURA 1) (NEFF et al., 2004).

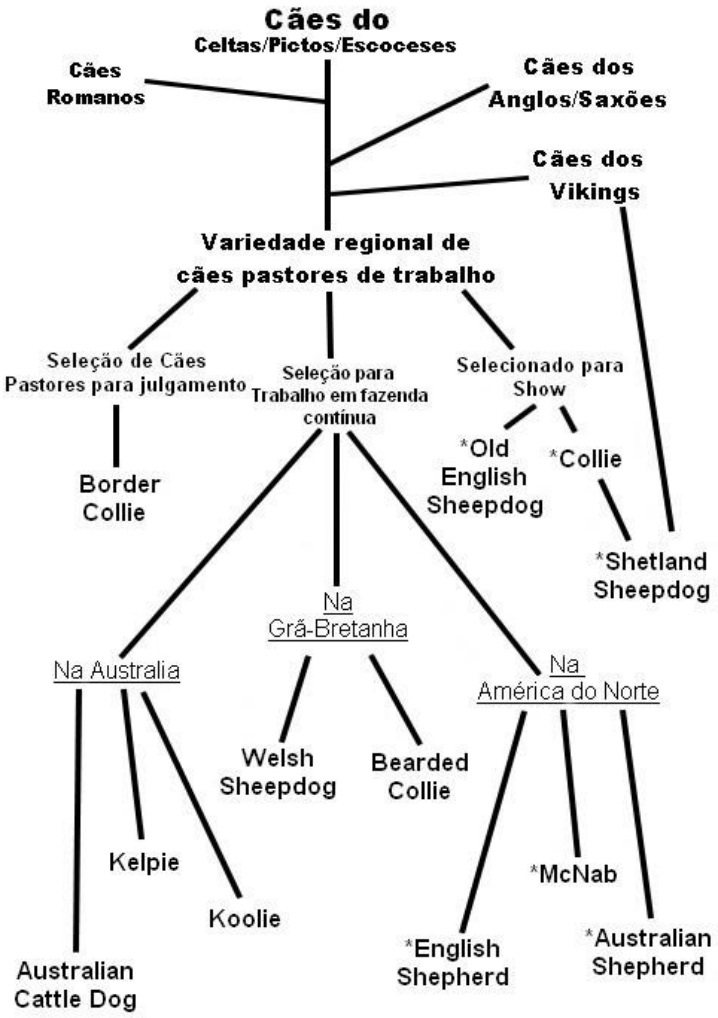

Figura 1 – A árvore genealógica dos Collies, um composto de histórias anedóticas de raças.
Fonte: Adaptado e traduzido de Neff et al. (2004).

O diagrama mostra relatos históricos entre as raças de pastoreio contemporâneas, que compartilham a linhagem Collie da Grã-Bretanha. As raças mostradas foram pesquisadas seletivamente quanto à presença de MDR1-1Δ. Raças que segregaram a mutação são mostradas com um asterisco (NEFF et al., 2004).

A população canina posterior em que foi registrado o MDR1-1Δ, possivelmente era uma combinação de cães de pastoreio, ancestrais dos cães pastores inglês e australianos, uma vez que a mutação em Galgos (*Sighthounds*), pode ser explicada pelo resultado do cruzamento entre Collies da rainha Vitoria e Borzois dados a ela, pelo Czar Nicolau II (NEFF et al., 2004).

A raça Whippet longhaired é implicada como antiga, porém, renovada na década de 1950 por um criador que também criava Shetland Sheepdog. Importante ressaltar que provavelmente um alelo mutante de MDR1-1Δ acompanhava essa raça durante a hibridização introgressiva, por ligação ou desvio (NEFF et al., 2004).

Nos anos 80, a raça Windhound Silken foi criada como produto de várias raças, como

Borzoi, Whippet e Whippet longhaired, sendo que a raça Whippet Longhaired é implicada como a provável portadora da mutação na formação da Windhound Silken. É importante ressaltar que o polimorfismo de MDR1-1Δ nas raças *Sighthound* confirma história evolutiva distinta (NEFF et al., 2004).

E assim, relacionando a idade do alelo, pesquisas sugerem que a mutação precursora se deu entre 40 e 120 gerações anteriores a divergência de raças, inferindo que a mutação MDR1-1Δ não era tão antiga (250 gerações), sendo um alelo que surgiu mais recente dentro da linhagem dos Collies. Estimando a idade do alelo mutante, prevê-se que a mutação ocorreu numa faixa de tempo após o século XIV (NEFF et al., 2004).

2.2 RAÇAS PORTADORAS DA MUTAÇÃO MDR1-1Δ

Com o passar das gerações a mutação MDR1-1Δ foi pouco disseminada, no entanto, com advento e introdução de um novo parasiticida na década de 1980, descobriu-se que existiam alguns cães sensíveis ao medicamento (CAMPBELL et al., 1983). Devido o relato de efeitos adversos nos tratamentos clínicos de determinadas raças caninas, estudos foram conduzidos e relacionaram a maior sensibilidade dos animais à mutação no gene MDR1 (MDR1-1Δ) (GEYER et al., 2007).

As raças caninas descritas como portadoras da mutação MDR1-1Δ são: Collies (MEALEY et al., 2001), Australian Shepherd Dog (NELSON et al., 2003), Whippet longhaired, McNab, Old English Sheepdog, Shetland Sheepdog, Silken Windhound, Australian Shepherd miniature (NEFF et al., 2004), White Swiss Shepherd (GEYER et al., 2007), Chinook, Danish-Swedish Farmdog (DONNER et al., 2016), Waller (GEYER et al., 2005a), Border Collie (GEYER et al., 2005b), Smooth Collie (TAPPIN et al., 2012) e Bearded Collie (MARELLI et al., 2020).

Um estudo mostrou que cães Pastores Alemães apresentaram a mutação de deleção no gene MDR1. No entanto, dois dos referidos animais tinham pelagem branca, enquanto outro apresentava paternidade desta coloração. Para os autores, a mutação MDR1-1Δ em cães pastores alemães pode estar ligado ao alelo da pelagem branca, porém, não se tem estudos que a relacionem à mutação MDR1-1Δ (MEALEY; MEURS, 2008).

Existe a possibilidade de mutação nas raças misturadas, e em cães de raça hibrida, descendentes de cães portadores da mutação MDR1-1Δ, porém, são poucos ou ausentes os relatos (GRAMER et al., 2011; MEALEY; MEURS, 2008; NEFF et al., 2004).

2.3 PRINCIPAIS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA MUTAÇÃO MDR1-1Δ

Por anos houve pesquisas em populações de cães, com base em filogenia (a partir do parentesco com Collie) e em fenótipo (relatos de sensibilidade de medicamentos), para determinar o genótipo MDR1-1Δ nos animais. Apesar de existir o diagnóstico clínico, o mesmo não pode ser considerado padrão ouro, visto o advento do diagnóstico molecular (NEFF et al., 2004).

O diagnóstico molecular de animais com deleção em gene MDR1-1Δ é feito por meio de genotipagem, ou seja, um método biomolecular que utiliza a amplificação do gene de interesse pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), por exemplo (GEYER et al., 2005a). Inicialmente, a genotipagem dos animais, principalmente os Collies e demais raças, para localizar essa mutação foi realizada utilizando a técnica de sequenciamento ou o método de PCR tradicional, por ser uma ferramenta mais amplamente distribuída e sendo um método diagnóstico fidedigno (HUGNET; BENTJEN; MEALEY, 2004; MEALEY et al., 2001; MEALEY; NORTHRUP; BENTJEN, 2003; NEFF et al., 2004; NELSON et al., 2003). Porém, a genotipagem pode ser realizada por meio de várias técnicas moleculares, como PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (GEYER et al., 2005b; ROULET et al., 2003); PCR em tempo real (qPCR) (KLINTZSCH al., 2010) e PCR alelo-específico (BAARS et al., 2008).

O método de PCR é o mais comum para genotipagem e identificação da mutação no gene MDR1 em caninos, nos quais ocorre a amplificação de um segmento do DNA genômico e separação dos amplicons por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para visualização do alelo selvagem ou alelo mutante por meio do peso molecular do amplicon (GEYER et al., 2005b; ROULET et al., 2003). No entanto, algumas pesquisas aplicam o método de sequenciamento após a técnica de PCR, a fim de trazer mais confiabilidade ao diagnóstico, uma vez que as diferenças entre os alelos se dá por ausência de quatro pares de bases (4pb) (MEALEY; MUNYARD; BENTJEN, 2005; ROULET et al., 2003).

Nos estudos, as amostras extraídas do DNA foram amplificadas por PCR na região flanqueadora nt230, no exón 4 do gene MDR1, seguido de marcação e análise dos amplicons por a*mplified fragment length polymorphism* (AFLP), corrida em gel de poliacrilamida (PAGE), e posterior análise (GEYER et al., 2005a; GEYER et al., 2005b; HUGNET; BENTJEN; MEALEY, 2004; MEALEY; MUNYARD; BENTJEN, 2005; NEFF et al., 2004).

A PCR provou ser específica, com triagem robusta, econômica e rápida, bem como

reproduzindo resultados confiáveis, podendo assim, ser substituto do sequenciamento. Com a utilização do método de PCR a mutação MDR1-1Δ está sendo frequentemente diagnosticada, evitando-se o diagnóstico apoiado apenas em sintomas clínicos e permitindo que cada paciente receba terapêutica própria e adaptada, rechaçando o uso de substratos da glicoproteína-P e risco de intoxicações (BAARS et al., 2008).

A análise da expressão gênica em cães portadores da mutação MDR1-1Δ é feita por técnicas como: qPCR ou real time-PCR (GRAMER; KESSLER; GEYER, 2015), RT-qPCR (ROULET et al., 2003) e TaqMan ou ensaio para 5' nuclease fluorescente (KLINTZSCH et al., 2010).

No estudo de Roulet et al. (2003) utilizou-se RT-qPCR, para extração de RNA total a partir de amostras do colón e, posteriormente testaram o DNA com células da boca. Nesse estudo foi possível identificar a exclusão dos quatro pares de base, bem como comparar o genótipo selvagem com o genótipo mutante. Além disso, documentou-se a primeira sequência completa de cDNA MDR1 em Collie sensível à ivermectina. Os autores também enfatizaram que a extração de células da boca (menos invasiva) não mostrou ser confiável devido a contaminação por DNA bacteriano.

A técnica de qPCR é quantitativa, porém, pode ser utilizada para análises qualitativas, verificando a presença ou ausência de uma sequência alélica específica (MORGANTE; BLAWID, 2016). Nesse sentido, Gramer, Kessler e Geyer (2015) avaliou os níveis de expressão do gene MDR1 por qPCR, para avaliar a tolerância ao tratamento com quimioterápicos em cães, e verificou que animais apresentando efeitos adversos ao tratamento também apresentavam menor expressão do gene MDR1.

A análise de expressão por *TaqMan* é um método quantitativo e Klintzsch et al. (2010) relatou o uso dessa técnica para fazer o diagnósticos da mutação MDR1-1Δ, associando com o PCR em tempo real. Além disso, é utilizada em ensaios para genotipagem de SNPs, deleções ou inserções de nucleotídeos (HUI; DELMONTE; RANADE, 2008). Está técnica mostrou-se eficiente e facilitadora para diagnóstico de mutação MDR1-1Δ, além de ser um método específico e confiável, com algumas vantagens: não utiliza produtos químicos, como o gel de acrilamida e brometo de etídio; não é um processo intensivo; e ainda possui alta especificidade e confiabilidade, sendo útil no diagnósticos de rotina (KLINTZSCH et al., 2010).

O sequenciamento é utilizado em determinado momento no diagnóstico da mutação MDR1-1Δ, para confirmação após aplicação de outras técnicas, principalmente em pesquisas. É um processo de alto custo, precisando de um equipamento disponível e sendo pouco usufruído

(BAARS et al., 2008). Porém, é utilizado para determinar diretamente os genótipos *in locos* (KLINTZSCH et al., 2010).

Existem métodos pós-PCR para análise de variações genéticas nas sequências de nucleotídeo, ou seja, genotipagem, por exemplo *PCR-hig-resolution melting* (PCR-HRM) e o *PCR-restriction-fragment length polymorphism* (PCR-RFLP). O HRM é um método simples e rápido, sendo qualitativo, que permite observar a ligação de corantes com a dsDNA pela curva de melting. Discrimina sequência de DNA através de seu comprimento e sua estrutura, conteúdo de guanina e citosina ou complementaridade de cadeia. Essa técnica tem como vantagens: ser econômico em relação a ensaios de sonda, é mais simples e elimina o risco de contaminação, por ser um tubo fechado. Sendo uma ferramenta rápida, específica e confiável para detectar a mutação de MDR1-1Δ. Ao passo que a técnica de RFLP, é utilizada para determinação da frequência alélica nos cães. Pode ser uma técnica demorada, porém detém uso de menos tecnologias, apesar de ser método reprodutível, eficiente e econômico (SILVESTRO et al., 2019).

3 IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO DA MUTAÇÃO MDR1-1Δ

Uma das principais compreensões da genética do MDR1 se dá na resposta a diferentes medicamentos que podem ser usados para identificar o indivíduo com a mutação, ou seja, aqueles propensos a efeitos adversos. Antigamente, veterinários se negavam a usar medicamentos, como ivermectina, nos animais que poderiam apresentar reações adversas, como raças de pastoreios e Collies. No entanto, hoje essa prática é desnecessária, pois no meio veterinário existem testes de DNA para a mutação MDR1-1Δ que podem ser usados para identificar animais portadores antes do uso de certos medicamentos. E assim, submetê-los a terapias com base em seu genótipo após o rastreamento, não precisando negar tratamento a raças fenotipicamente suspeitas, por exemplo, garantindo terapêutica eficaz (NEFF et al., 2004).

A suscetibilidade a efeitos adversos por intoxicação medicamentosa não é a única consequência da mutação no gene MDR1. Além de alterações na farmacocinética das drogas, animais portadores da mutação MDR1-1Δ podem possuir suscetibilidade a certas doenças (GEYER et al., 2005a). Em humanos, por exemplo, polimorfismos de base única (SNPs) que afetam o gene MDR1 tornam o indivíduo suscetível a tumores renais (SIEGSMUND et al., 2002), doença de Parkinson (DROZDZIK et al., 2003) e câncer de mama (KAFKA et al., 2003).

É certo que a mutação, como a MDR1-1Δ, tem estreita relação com a disposição de medicamentos, eficácia e até toxicidade do uso de substratos de glicoproteína-P. Ainda, nenhum polimorfismo é tão notório como o relatado em Collies e outros cães citados como portadores da mutação, uma vez que os mesmos podem apresentar fenótipo nulo de glicoproteína-P, exacerbando ainda mais as reações adversas em caso de utilização de substratos dessa proteína (MEALEY et al., 2008).

A glicoproteína-P possui um amplo alvo de substratos, e a genética pode influenciar e alterar sua codificação. Dessa forma, é evidente que a mutação MDR1-1Δ pode alterar as concentrações de fármacos no indivíduo, e alterar as respostas terapêuticas. Sendo assim, as variações genéticas individuais são difíceis de serem ignoradas, dado o impacto que o polimorfismo de deleção MDR1-1Δ causa no paciente em relação ao efeito farmacológico. Outro ponto importante é considerar o histórico clínico do animal, que apresenta quadro de intoxicação após o uso de fármacos que são substratos de glicoproteína-P, que levaria à suspeita clínica de animal portador do gene mutante (MARTINEZ et al., 2008).

Para raças de risco, é interessante a genotipagem dos animais a fim de descobrir a presença de MDR1-1Δ, e com isso selecionar protocolos terapêuticos adequados, dosagem dos medicamentos e descoberta de substratos que são tóxicos acima das concentrações relatadas (ERKENS et al., 2009).

Ademais, é importante ressaltar que o gene MDR1 é passado para gerações futuras, e cães heterozigotos (MDR1 +/-) são menos susceptíveis a intoxicação e apresentam menor sensibilidade que cães mutantes (MDR1 -/-), os quais apresentam maior grau de intoxicação (BISSONNETTE et al., 2009; DOWLING, 2006). Não obstante, são conhecidos mais de 20 medicamentos que são substratos da glicoproteína-P e cada um pode exibir uma curva diferente e singular de relação dose-toxicidade entre os genótipos de MDR1. Assim, a diferença genética entre as raças caninas, bem como no fenótipo de glicoproteína-P, pode influenciar nas interações genético-medicamentosas (NEFF et al., 2004).

Neff et al. (2004) citam que a farmacogenética atual pode ser uma ferramenta para selecionar animais com base no genótipo, a fim de eliminar essa mutação do fundo genético (pool genético) traçando estratégias para cada raça. Por exemplo, na raça Shetland Sheepdog que apresentam baixa frequência do alelo mutante com alto número de animas seria possível a remoção do alelo mutante em algumas gerações, ao passo que para a raça Whippet longhaired, pode-se tentar reduzir a frequência do alelo mutante de forma crônica e a longo prazo, visto que a raça possui alta frequência da mutação e menor número de animais.

4 GLICOPROTEÍNA-P, PRODUTO DO GENE MDR1

A glicoproteína P (gp-P) é uma proteína transmembranar, expressa na membrana plasmática como produto do gene MDR1 (*multi resistence drugs*), também descrito como ABCB1 (família ABC transportadora, membro da superfamília *ATB binding cassete*) (JULIANO; LING, 1976; MEALEY, 2004). Essa proteína é responsável pelo transporte de diversas classes de medicamentos para a absorção intestinal, distribuição, metabolização e excreção em fígado e rim, influenciando na farmacocinética e farmacodinâmica, cuja subexpressão provoca resistência frente alguns fármacos, ou seja, aqueles que a utilizam como transportador (LINARDI; NATALINI, 2006; MEALEY; NORTHRUP; BENTJEN, 2003).

No cenário evolutivo, a gp-P evoluiu funcionalmente para a capacidade protetora para os mamíferos, evitando ou eliminando a exposição a xenobióticos, que são potencialmente tóxicos ao organismo (DEAN; ANNILO, 2005).

A glicoproteína-P ficou famosa entre os oncologistas por apresentar seu papel interligado a resistência a múltiplas drogas quimioterapêuticas, sendo ela descoberta pela primeira vez em uma linhagem celular resistente a múltiplas drogas (DEGORTER et al., 2012). Posteriormente, a expressão da glicoproteína-P foi identificada em tecidos não carcinogênicos, inicialmente em humanos e roedores, e após anos evidenciou-se que espécies de animais de companhia, como os caninos, também a expressavam (GINN, 1996; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005). Dados publicados revelaram que essa proteína está expressa em células endoteliais e capilares cerebrais, fazendo parte da barreira hematoencefálica e restringindo a entrada de compostos tóxicos no sistema nervoso central (CORDON-CARDO et al., 1989; FROMM, 2004).

Do ponto de vista estrutural a gp-P é uma grande proteína transmembranar glicosilada (170 kDa), apresentando 1276 a 1280 aminoácidos, que consiste em duas porções hidrofóbicas transmembranares constituindo cada uma delas um sítio de ligação a nucleotídeos NBD (*nucleotide-binding domain*) estando voltados ao citoplasma, e possuem um local de ligação ATP intracelular (BORST; ELFERINK, 2002; SCHINKEL et al., 1994; SHILLING et al., 2006).

A gp-P possui como principal função impedir a absorção de compostos tóxicos do intestino para o corpo e expulsá-los através da bile ou urina (HENNESSY; SPIERS, 2007). Devido a essa função, foi observada sua expressão em vários órgãos, principalmente de mamíferos, como em intestino, pulmão, cérebro, rim, placenta, útero e testículo (FROMM, 2004; MEALEY; FIDEL, 2015; THUERAUF; FROMM, 2006).

A glicoproteína-P pode funcionar de três (3) maneiras: 1 - limitando a entrada de xenobióticos administradas por via oral, uma vez que estão expressas na membrana de enterócitos; 2 - eliminando xenobióticos que atingem a circulação sistêmica, por meio da excreção biliar e renal, pois está expressa na membrana canalicular hepática e células do túbulo contorcido proximal nos rins; 3 - limitando a distribuição de xenobióticos aos tecidos a partir da circulação sanguínea, protegendo tecidos sensíveis (KIM, 2003).

A expressão da glicoproteína P nas membranas luminais das células endoteliais dos capilares cerebrais (a barreira hematoencefálica) impedem a entrada de determinados medicamentos no sistema nervoso central por mecanismo de transporte baseado em efluxo (FROMM, 2004). Sendo assim, o funcionamento incorreto da gp-P pode gerar reações adversas a medicamento, e os principais motivos são pela penetração aumentada do medicamento no cérebro ou diminuição na liberação/excreção da droga pelas devidas vias (MEALEY; DASSANAYAKE; BURKE, 2017).

A suscetibilidade dos animais de se intoxicarem distingue a importância da glicoproteína-P na restrição de expor o tecido cerebral a vários compostos, que podem levar a um quadro de neurotoxicose (MEALEY et al., 2007). Dessa forma, animais que apresentam defeito na função da gp-P são suscetíveis à toxicose quando utilizados medicamentos, em doses rotineiras, que são substratos para essa glicoproteína (MEALEY et al., 2001).

A mutação MDR1-1Δ culmina com a redução na expressão e menor disponibilidade de gp-P funcional distribuída no organismo do animal. Dessa forma, há maior sensibilidade a vários medicamentos substratos da gp-P, podendo levar a intoxicação do animal, acometendo principalmente o sistema nervoso central, uma vez que os medicamentos alcançam grandes concentrações e redução na excreção renal e hepática (GEYER et al., 2005b; MEALEY et al., 2001). É comum em cães de pastoreio, como relatado em Collies, e apresenta um importante papel na terapêutica. Por exemplo, nesses animais há maior sensibilidade a drogas quimioterápicas, como a doxorrubicina ou vincristina utilizadas no tratamento de linfoma, observadas pela mielossupressão (mesmo com baixas doses) e gastroenterite. Em contrapartida, animais portadores da mutação MDR1-1Δ toleram altas doses de ciclofosfamida (MEALEY; NORTHRUP; BENTJEN, 2003).

Quando a gp-P é comprometida, ocorre também o comprometimento da barreira hematoencefálica e dificuldade na expulsão de xenobióticos que adentram o sistema nervoso central (MEALEY; MEURS, 2008). Devido a isso, por exemplo, ocorre acúmulo de ivermectina no SNC, o que resulta em sintomas de neurotoxicidade, como depressão aparente, ataxia, midríase e salivação (PAUL; TRANQUILLI; HUTCHENS, 2000), entre outros

sintomas como desorientação, tremores, sonolência, coma e até morte, a depender do quadro de intoxicação (FECHT et al., 2007; GEYER; JANKO, 2012).

4.1 SUBSTRATOS E INIBIDORES DA GLICOPROTEÍNA-P

Característica importante da gp-P, e dos seus substratos, é a grande diversidade, principalmente em questões de estrutura e função, uma vez que podem variar desde pequenas moléculas, como também cátions orgânicos, aminoácidos, carboidratos, antibióticos, polissacarídeos e proteínas (WANG et al., 2003). O Quadro 1 abaixo, inicialmente publicada por Mealey e Fidel (2015) e atualizada com dados de Sato, Tohyama e Kosugi (2020) e Deshpande et al. (2016), resume os substratos conhecidos para a glicoproteína-P.

Quadro 1: Classes terapêuticas e seus respectivos fármacos substratos da glicoproteína-P

Alcaloides de Vinca*	**Antifungicos**	**Imunossupressores**
Vinblastina	Cetoconazol	Ciclosporina
Vincristina	Itraconazol	Tacrolimus
Vinorelbina		
Epipodophyllotoxin*	**Agentes Antiparasitários**	**Outros**
Etoposídeo	Doramectina	Butorfanol*
Teniposídeo	Ivermectina*	Loperamida*
	Milbemicina*	Ondasentrona
	Moxidectina*	Domperidona
	Selamectina*	Quinidina (SATO; TOHYAMA; KOSUGI, 2020)
Camptotecina*		Erlotinibe (SATO; TOHYAMA; KOSUGI, 2020)
Irinotecano		Acepromazina*
Topotecano		Morfina
Antimicrobianos	**Cardíacos**	Fentanil* (DESHPANDE et al., 2016; THOMPSON et al., 2000)
Eritromicina	Digoxina*	Alfentanil (WANDEL et al., 2002)
Doxiciclina	Diltiazem	Sufentanil (WANDEL et al., 2002)
Tetraciclina	Verapamil	
Levofloxacina		
Sparfloxacina		

*: Fármacos relacionados com a mutação específica em cão; demais fármacos relacionados a humano ou roedores.
Fonte: Mealey e Fidel (2015) com atualização por Sato, Tohyama e Kosugi (2020) e Deshpande et al. (2016).

Drogas inibidoras de gp-P apresentam três mecanismos de ação: 1 - bloqueando a droga no sítio de ação, seja por modo competitivo ou não competitivo, ou ligando-se ao sítio alostérico; 2 - interferindo na hidrólise de ATP, ativando a função de gp-P; 3 - alterando a integridade dos lipídios da membrana celular (MARCHETTI et al., 2007).

As drogas inibitórias de gp-P aumentam a exposição do animal a um substrato da mesma, devido atraso da excreção biliar. Por exemplo, a associação cetoconazol e ivermectina em cães normais acelerara a entrada da ivermectina no sistema nervoso central (causando neurotoxicidade), uma vez que o cetoconazol funciona como inibidor de gp-P. Assim, cães não mutantes para o gene MDR1 apresentariam sintomas característicos de animais portadores da mutação MDR1-1Δ (COELHO et al., 2009).

O Quadro 2, publicada por Mealey e Fidel (2015), resume os inibidores conhecidos para a glicoproteína-P.

Quadro 2: Classes terapêuticas e seus respectivos fármacos inibidores da glicoproteína-P

Antidepressivos	**Drogas Cardíacas**
Fluoxetina	Diltiazem
Paroxetina	Nicardepina
	Quinidina
	Verapamil
Antimicrobianos	
Eritromicina	
Antifúngicos	**Imunossupressores**
Cetoconazol*	Ciclosporina
Itraconazol	Tacrolimunos
Outras classes	
Tamoxifeno	
Espinosade*	

*: Evidência de interações medicamentosas mediadas por gp-P em cães em doses clinicamente usadas.
Fonte: Mealey e Fidel (2015).

Ainda, há relatos de intoxicação por outras drogas como fluralaner (GAENS et al., 2019a), Emodepside e praziquantel associados (GAENS et al., 2019b), porém, não há confirmação se essas drogas são substratos para gp-P, devido ao *status* desconhecido de MDR1 dos animais e por outros fatores, como jejum recomendado na administração desses fármacos (GAENS et al., 2019a; GAENS et al., 2019b). Assim, ao conhecer a gravidade dos efeitos adversos em cães portadores de MDR1-1Δ, evita-se o uso de medicamentos, evitando disfunções que medicamentos causam em animais com essa mutação (MEALEY; DASSANAYAKE; BURKE, 2017).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conhecer variações genéticas específicas de cada espécie e raça animal torna-se cada vez mais importante na Medicina Veterinária, pois cada paciente deve ser submetido à terapêutica respeitando-se sua identidade genética.

Os avanços no âmbito da farmacogenética ajudam a esclarecer falhas terapêuticas ou efeitos adversos. Assim, com a investigação da mutação de deleção no gene MDR1 em cães de raças predispostas, será possível identificar os genótipos predominantes de acordo com as raças e antever uma série de complicações clínicas decorrentes da administração de medicamentos que utilizam a glicoproteína-P como transportadora. Além disso, a classificação do animal como homozigoto (MDR1 +/+ ou MDR1-/-) ou heterozigoto (MDR1 +/-) implicaria em ajustes terapêuticos e menor risco de intoxicação.

Não obstante, a identificação da mutação permite aos tutores e médicos veterinários ações relativas à reprodução desses animais, diluindo o gene mutante entre as gerações futuras e facilitando a terapêutica nas raças mais predisponentes à mutação do gene MDR1.

6 REFERÊNCIAS

AMBUDKAR, S. V. et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, n. 47, p. 7468-7485, 2003.

BAARS, C. et al. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs. **Veterinary Journal**, London, v. 177, n. 3, p. 394-397, 2008.

BISSONNETTE, S. et al. The ABCB1-1Δ mutation is not responsible for subchronic neurotoxicity seen in dogs of non Collie breeds following macrocyclic lactone treatment for generalized demodicosis. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 60-66, 2009.

BORST, P.; ELFERINK, R. O. Mammalian ABC transporters in health and disease. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 71, n. 1, p. 537-592, 2002.

CAMPBELL, W. C. et al. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. **Science**, Washington, v. 221, n. 4613, p. 823-828, 1983.

COELHO, J. C. et al. Biliary excretion of technetium 99m-sestamibi in wild-type dogs and in dogs with intrinsic (ABCB1-1Δ mutation) and extrinsic (ketoconazole treated) P-glycoprotein deficiency. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 417-421, 2009.

CORDON-CARDO, C. et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 86, n. 2, p. 695-698, 1989.

DEAN, M.; ANNILO, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 6, p. 123-142, 2005.

DEGORTER, M. K. et al. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 52, p. 249-273, 2012.

DESHPANDE, D. et al. The effect of the canine ABCB1 1Δ mutation on sedation after intravenous administration of acepromazine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 30, n. 2, p. 636-641, 2016.

DONNER, J. et al. Genetic panel screening of nearly 100 mutations reveals new insights into the breed distribution of risk variants for canine hereditary disorders. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 8, p. 1-18, 2016.

DOWLING, P. Pharmacogenetics: it’s not just about ivermectin in collies. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 47, n. 12, p. 1165, 2006.

DROZDZIK, M. et al. Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. **Pharmacogenetics and Genomics**, Hagerstown, v. 13, n. 5, p. 259-263, 2003.

EADIE, L. N.; HUGHES, T. P.; WHITE, D. L. Interaction of the efflux transporters ABCB1 and ABCG2 with imatinib, nilotinib, and dasatinib. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, St. Louis, v. 95, n. 3, p. 294-306, 2014.

ERKENS, T. et al. Presence of the ABCB1 (MDR1) deletion mutation causing ivermectin hypersensitivity in certain dog breeds in Belgium. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, Ghent, v. 78, n. 4, p. 256-260, 2009.

FECHT, S. et al. Analysis of the Canine MDR1− 1Δ mutation in the dog breed elo. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, Belin, v. 54, n. 8, p. 401-405, 2007.

FROMM, M. F. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 54, n. 10, p. 1295-1310, 2002.

FROMM, M. F. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 25, n. 8, p. 423-429, 2004.

GAENS, D. et al. Suspected neurological toxicity after oral application of fluralaner (Bravecto®) in a Kooikerhondje dog. **BMC Veterinary Research**, London, v. 15, n. 1, p. 283, 2019a.

GAENS, D. et al. Adverse drug reactions after administration of emodepside/praziquantel (Profender®) in an MDR1-mutant Australian Shepherd dog: case report. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 6, p. 296, 2019b.

GEYER, J. et al. Detection of the nt230 (del4) MDR1 mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 482-485, 2007.

GEYER, J. et al. Development of a PCR based diagnostic test detecting a nt230 (del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin sensitive Australian Shepherd. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 95-99, 2005b.

GEYER, J. et al. Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 545-551, 2005a.

GEYER, J.; JANKO, C. Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, v. 13, n. 6, p. 969-986, 2012.

GINN, P. E. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 33, n. 5, p. 533-541, 1996.

GRAMER, I. et al. Breed distribution of the nt230 (del4) MDR1 mutation in dogs. **Veterinary Journal**, London, v. 189, n. 1, p. 67-71, 2011.

GRAMER, I.; KESSLER, M.; GEYER, J. Determination of MDR1 gene expression for prediction of chemotherapy tolerance and treatment outcome in dogs with lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, London, v. 13, n. 4, p. 363-372, 2015.

HENNESSY, M.; SPIERS, J. P. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. **Pharmacological Research**, London, v. 55, n. 1, p. 1-15, 2007.

HUGNET, C.; BENTJEN, S. A.; MEALEY, K. L. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 227-229, 2004.

HUI, L.; DELMONTE, T.; RANADE, K. Genotyping using the TaqMan assay. **Current Protocols in Human Genetics**, Hoboken, v. 56, n. 1, p. 2.10. 1-2.10. 8, 2008.

JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes**, Amsterdam, v. 455, n. 1, p. 152-162, 1976.

KAFKA, A. et al. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 22, n. 5, p. 1117-1121, 2003.

KERB, R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. **Cancer Letters**, Virginia, v. 234, n. 1, p. 4-33, 2006.

KIM, R. B. Drug transporters in HIV therapy. **Topics in HIV Medicine: a Publication of the International AIDS Society, USA**, Genebra, v. 11, n. 4, p. 136-139, 2003.

KLINTZSCH, S. et al. Detection of the nt230 [del4] MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5′ nuclease taqman allelic discrimination method. **Veterinary Journal**, London, v. 185, n. 3, p. 272-277, 2010.

LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 204, n. 3, p. 216-237, 2005.

LINARDI, R. L.; NATALINI, C. C. Multi-drug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodymanic of therapeutic drugs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 336-341, 2006.

MARCHETTI, S. et al. Concise review: clinical relevance of drug-drug and herb-drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). **Oncologist**, Dayton, v. 12, n. 8, 927-941, 2007.

MARELLI, S. P. et al. Genotypic and allelic frequencies of MDR1 gene in dogs in Italy. **Veterinary Record Open**, London, v. 7, n. 1, p. e000375, 2020.

MARTINEZ, M. et al. The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 285-300, 2008.

MEALEY, K. L. et al. Comparison of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in MDR1-1Δ and MDR1 wildtype dogs. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, Malden, v. 17, n. 1, p. 61-66, 2007.

MEALEY, K. L. et al. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the MDR1 gene. **Pharmacogenetics and Genomics**, Hagerstown, v. 11, n. 8, p. 727-733, 2001.

MEALEY, K. L. et al. P-glycoprotein contributes to the blood-brain, but not blood-cerebrospinal fluid, barrier in a spontaneous canine p-glycoprotein knockout model. **Drug Metabolism and Disposition**, Switzerland, v. 36, n. 6, p. 1073-1079, 2008.

MEALEY, K. L. Therapeutic implications of the MDR1 gene. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 257-264, 2004.

MEALEY, K. L.; DASSANAYAKE, S.; BURKE, N. S. Establishment of a cell line for assessing drugs as canine P-glycoprotein substrates: proof of principle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 545-551, 2017.

MEALEY, K. L.; FIDEL, J. P-glycoprotein mediated drug interactions in animals and humans with cancer. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2015.

MEALEY, K. L.; MEURS, K. M. Breed distribution of the ABCB1-1Δ (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 233, n. 6, p. 921-924, 2008.

MEALEY, K. L.; MUNYARD, K. A.; BENTJEN, S. A. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 131, n. 3-4, p. 193-196, 2005.

MEALEY, K. L.; NORTHRUP, N. C.; BENTJEN, S. A. Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 223, n. 10, p. 1453-1455, 2003.

MORGANTE, C. V.; BLAWID, R. **Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real**: princípios e fundamentos. 1. ed. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2016.

NEFF, M. W. et al. Breed distribution and history of canine MDR1-1Δ, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, Washington, v. 101, n. 32, p. 11725-11730, 2004.

NELSON, O. L. et al. Ivermectin toxicity in an Australian Shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in Collies. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 17, n. 3, p. 354-356, 2003.

PAUL, A. J.; TRANQUILLI, W. J.; HUTCHENS, D. E. Safety of moxidectin in avermectin-sensitive Collies. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 61, n. 5, p. 482-483, 2000.

ROULET, A. et al. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 460, n. 2-3, p. 85-91, 2003.

SATO, S.; TOHYAMA, K.; KOSUGI, Y. Investigation of MDR1-overexpressing cell lines to derive a quantitative prediction approach for brain disposition using in vitro efflux activities. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 142, p. 105119, 2020.

SCHINKEL, A. H. et al. Disruption of the mouse MDR1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. **Cell**, Cambrige, v. 77, n. 4, p. 491-502, 1994.

SHILLING, R. A. et al. New light on multidrug binding by an ATP-binding-cassette transporter. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 195-203, 2006.

SIEGSMUND, M. et al. Association of the P-glycoprotein transporter MDR1C3435T polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 13, n. 7, p. 1847-1854, 2002.

SHI, M. M.; BLEAVINS, M. R.; FELIX, A. Pharmacogenetic application in drug development and clinical trials. **Drug Metabolism and Disposition**, Switzerland, v. 29, n. 4, p. 591-595, 2001.

SILVESTRO, C. A. et al. Two methods for genotyping a 4-base deletion in the canine ABCB1 gene. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 31, n. 6, p. 889-892, 2019.

TAPPIN, S. W. et al. Frequency of the mutant MDR1 allele in dogs in the UK. **Veterinary Record**, London, p. vetrec-2012-100633, 2012.

THOMPSON, S. J. et al. Opiate-induced analgesia is increased and prolonged in mice lacking P-glycoprotein. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 92, n. 5, p. 1392-1399, 2000.

THUERAUF, N.; FROMM, M. F. The role of the transporter P-glycoprotein for disposition and effects of centrally acting drugs and for the pathogenesis of CNS diseases. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, Berlin, v. 256, n. 5, p. 281-286, 2006.

WANDEL, C. et al. Interaction of morphine, fentanyl, sufentanil, alfentanil, and loperamide with the efflux drug transporter P-glycoprotein. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 96, n. 4, p. 913-920, 2002.

WANG, R. B. et al. Structure–activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 203-228, 2003.

ZALCBERG, J. R. et al. Cellular and karyotypic characterization of two doxorubicin resistant cell lines isolated from the same parental human leukemia cell line. **International Journal of Cancer**, New York, v. 57, n. 4, p. 522-528, 1994.

Terapêutica para diferentes tipos de choque em animais de companhia

Beathriz Giostri Pontes [1]
Débora Marciana da Silva Santos[2]
Letícia Azeredo de Freitas[3]
Tayna Avelino Pereira[4]
Leonardo Oliveira Trivilin[5]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: bia.giostri@gmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: deborasilvasantos02@gmail.com
[3] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: leticiaazeredof@gmail.com
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: taynaprinci2@hotmail.com
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: leotrivilin@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A síndrome do choque circulatório pode ser definida como uma grave insuficiência da perfusão capilar, inexistindo a capacidade de assegurar a fisiologia celular, que gera colapso orgânico pelo aporte e utilização inadequados de oxigênio, além da ausência de energia disponível refletidos como hipóxia e acidose metabólica. A síndrome inicia-se por um fator agressor (infeccioso ou não) que desencadeia uma série de falhas no funcionamento do organismo e ativação de ações endócrino-metabólicas para reestabelecer a homeostasia. Entretanto, se a compensação metabólica for inviável, o resultado será o óbito do animal (LAFORCADE; SILVERSTEIN, 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

O quadro de choque pode ser classificado quanto ao processo desencadeante e aos estágios de resposta do organismo descrito como compensado, quando em fase inicial o organismo é capaz de ativar mecanismos compensatórios por meio da interação responsiva de todos os sistemas; como descompensado quando por influência de um e/ou inúmeros fatores ocorre a interrupção da homeostasia e desencadeia efeitos colaterais ao animal, sendo passível de correção por meio da intervenção médico-veterinária (para danos celulares reversíveis); e irreversível, quando em seu estágio tardio abrange dano celular irrecuperável pela persistência dos efeitos nocivos ao animal, gerando comprometimento de órgãos-alvo e progressão para falência múltipla, e inevitavelmente para morte do paciente (LAFORCADE; SILVERSTEIN, 2015; RICHARD; WILCOX, 2014).

A classificação quanto ao processo desencadeante considera os diferentes fatores que levaram à hipoperfusão sanguínea, como hipovolemia, causa obstrutiva, causa cardiogênica ou causa vasculogênica, podendo esta última subclassificar em choques de causa neurogênica, séptica e anafilática (RICHARD; WILCOX, 2014). Vale ressaltar que a síndrome do choque circulatório caracteriza condição que evolui rapidamente para quadro gravíssimo se não monitorada criteriosamente, sendo empregados comumente cuidados intensivos de emergência que visam prezar pela recuperação do paciente animal e, indubitavelmente, pela sua vida.

2 MANEJO COMUM DO PACIENTE EM SITUAÇÃO DE CHOQUE

O suporte à vida direciona para as principais ações a serem realizadas a fim de estabilizar o animal (reanimação ou sustentação da vida), antes ou simultaneamente ao tratamento específico. O atendimento se inicia pela verificação das vias aéreas, possibilitando a proteção e desobstrução das mesmas. Posteriormente, deve ser instituída a ventilação e oxigenação, além

de correção da volemia. O animal é colocado em decúbito lateral e o pescoço esticado para facilitar a passagem de ar e, se necessária a oxigenoterapia também pode ser implementada (RICHARD; WILCOX, 2014).

A manutenção e correção da volemia serão realizadas por meio do acesso venoso (RICHARD; WILCOX, 2014) e de compressões torácicas que devem ser iniciadas imediatamente, uma vez que a ventilação é ineficaz na falta de fluxo sanguíneo (FLETCHER; BOLLER, 2013). As compressões torácicas objetivam o retorno do fluxo sanguíneo para os pulmões, possibilitando as trocas gasosas e viabilizando o fornecimento de oxigênio para os tecidos para reestruturação do metabolismo. A realização da técnica em cães e gatos ocorrerá em decúbito lateral esquerdo ou direito, com 100 a 120 compressões por minuto, a profundidade de 1/3 a 1/2 do tórax do animal (FLETCHER; BOLLER, 2013; MAIER et al., 1984).

Na correção e manutenção da volemia podem ser associados e infundidos cristalóides e colóides na proporção de 3:1, por preservarem a pressão coloidosmótica do meio intravascular, com rápido alcance da estabilidade hemodinâmica e oxigenação tecidual adequada, além da combinação culminar em efeitos mais duradouros e requerer menor volume de fluido para manter o efeito expansor (ZANCAN, 2014). A solução salina hipertônica 7,5 % possui importante efeito expansor que pode ser potencializado pela durabilidade de um colóide sintético (hidroxietilamido, por exemplo) adjunto (terapêutica de 5-10 mL/kg da combinação para cães e 2 mL/kg da combinação para gatos, com dose total não superior a 1 mL/kg/min, independente de espécie) (MAZZAFERRO; POWELL, 2013). Nos casos em que há comprometimento hepático o lactato pode ser ineficaz, devido à deficiência em converter lactato em bicarbonato de sódio (BENESI; KOGIKA, 2011; RAISER, 2008).

O exame físico deverá ser efetuado simultaneamente ao suporte à vida, uma vez que os sistemas nervoso central (SNC), cardiovascular, respiratório, renal e digestório são influenciados pela perda da homeostasia e se faz necessário o atendimento imediato (RICHARD; WILCOX, 2014). A hipotermia ou hipertermia podem ser corrigidas com o uso de cobertores, bolsas térmicas e ventilação mecânica (FLETCHER; BOLLER, 2013).

A terapêutica avançada no suporte à vida é fundamentada no monitoramento do animal, instituindo exames complementares como o eletrocardiograma, uso da desfibrilação elétrica ou por meio de batida precordial em caso de fibrilação ventricular, terapia medicamentosa, a qual variará de acordo com os sinais clínicos apresentados, podendo-se utilizar fármacos vasopressores (epinefrina), vagolíticos (atropina), agentes de reversão (naloxona), a corticoterapia e continuação da fluidoterapia com solução adequada (FLETCHER; BOLLER, 2013; RAISER, 2008). Posteriormente ao reestabelecimento do retorno venoso, alterações

bioquímicas como hipercalemia, hipoglicemia, hiperglicemia e hiperlactatemia podem ser identificadas para que seja feita a terapia adjuvante e normalização desses parâmetros, que resultam no melhor prognóstico do animal (HOPPER; BORCHERS; EPSTEIN, 2014).

2.1 TERAPÊUTICA COMUM A DIFERENTES TIPOS DE CHOQUE

2.1.1 Manutenção da pressão arterial

Para a normalização da pressão arterial após a reposição volêmica faz-se uso de catecolaminas exógenas por via intravenosa. Um exemplo é a dopamina, com dose de 2,5 a 15 µg/kg/min para gatos (CHACAR et al., 2014) e 10 µg/kg/min para cães (MORGAZ et al., 2017).

2.1.2 Ação antioxidante na prevenção de lesões celulares

Órgãos submetidos a um período de isquemia podem sofrer lesões no momento da reperfusão sanguínea, que se resumem em alterações tissulares funcionais e estruturais. Para a proteção desses tecidos são administrados fármacos adjuntos à fluidoterapia como profilaxia à hipóxia isquêmica. Exemplificando, o alopurinol na dosagem de 15 a 25 mg/kg para inibir a xantina oxidase (enzima geradora de espécies reativas de oxigênio); o mesilato de deferoxamina dosagem de 25 a 50 mg/kg na infusão em 5 minutos como quelante do ferro; o dimetilsulfóxido com terapêutica de 1 g/kg em 45 minutos e o açúcar hipertônico de 0,5 a 2 g/kg como captadores de radicais livres; e o superóxido dismutase, na dosagem de 5 mg/kg para eliminar radicais superóxidos (CARREIRA; NUNES, 2015; RAISER, 2008). A infusão de ácido docosahexaenoico (DHA) na dose de 0,15 g/kg/dia em ratos, como modelo experimental, promoveu a modulação positiva da dinâmica circulatória por meio da redução da inflamação e estresse oxidativo (BOIVIN et al., 2017).

2.1.3 Correção da acidose metabólica

O animal cursará com acidose metabólica devido incapacidade na exceção renal de compostos ácidos produzidos pelo metabolismo. Cães apresentam maior probabilidade de sobrevida quando apresentam hipotensão não associada a altos níveis de lactato sanguíneo (ATECA; DOMBROWSKI; SILVERSTEIN, 2015), também observado em gatos hipotensos

com níveis de lactato normais em unidade de terapia intensiva, se comparados a gatos hipotensos e hiperlactatêmicos (SHEA; DOMBROWSKI; SILVERSTEIN, 2017).

A correção ocorrerá pelo restabelecimento das perfusões renal e capilar. O bicarbonato de sódio é o alcalinizante de escolha quando é necessário corrigir a acidose metabólica de um animal em choque. A terapêutica será de 1 a 2 mEq/kg para os gatos e 2 a 4 mEq/kg para os cães, via intravenosa, por meio da diluição em 250 mL (gatos) e em 500 a 1000 mL (cães) de cloreto de sódio a 0, 9% ou glicose a 5 %. A variação observada no volume para diluição decorre do tamanho do animal (CARREIRA; NUNES, 2015; RAISER, 2008).

2.1.4 Antibioticoterapia profilática

Tecidos pertencentes ao sistema gastrointestinal, principalmente, alcançam níveis isquêmicos e podem apresentar acentuada produção de endotoxinas bacterianas em situação de choque, o que pode agravar o prognóstico e evolução da patologia no paciente. A antibioticoterapia profilática com antimicrobianos de largo espectro é uma medida cautelosa que visa evitar possíveis agravos no quadro (RAISER, 2008). O tratamento prévio com rifampicina em camundongos com choque endotóxico demonstrou aumento na sobrevida por meio da modulação de citocinas inflamatórias com inibição da produção de TNF-α e IL-6, e aumento dos níveis de IL-10 (AN et al., 2008).

3 TERAPÊUTICA DE ACORDO COM AS CLASSIFICAÇÕES DO CHOQUE

3.1 CHOQUE HIPOVOLÊMICO

É caracterizado pela insuficiência circulatória decorrente das diminuições do débito cardíaco e perfusão sanguínea (OLIVEIRA et al., 2015; RAISER, 2008) devido menor volume de sangue circulando e falha na oferta de oxigênio (MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014) e nutrientes para os tecidos, ou na utilização desses suprimentos. Pode ocasionar alteração do metabolismo e morte celular, disfunção e até falha dos órgãos (RAISER, 2008). Esta classificação advém da perda volêmica, que pode ocorrer mais frequentemente por hemorragia (MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014), ou desidratação, perda plasmática ou de forma traumática (FELICE et al., 2011).

A fisiopatogenia do choque hipovolêmico compreende a união de sintomas e sinais que caracterizam o colapso circulatório agudo, determinado por baixa no volume sanguíneo

causando hipoperfusão tecidual (MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014). O volume vascular impróprio origina diminuição do retorno venoso, redução do débito cardíaco (FELICE et al., 2011) e baixa da pressão de preenchimento capilar (MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014). Nesta síndrome há queda no oferecimento de oxigênio, provocando hipóxia celular e desregulação dos processos bioquímicos celulares, podendo tornar-se sistêmico. O efeito causado pela falta de oxigenação é reversível inicialmente, mas pode se tornar irreversível sem o tratamento emergencial. Se irreversível, desencadeia morte celular, lesão e falha dos órgãos, e consequentemente morte (FELICE et al., 2011).

Animais em choque apresentam sinais clínicos específicos: a temperatura pode variar de normal a baixa, sendo que alguns animais exibem extremidades frias, alterações metabólicas como acidose lática, pulso femoral fraco, pressão arterial normal ou diminuída (TELES; LOURENÇO, 2015), taquicardia, oligúria e o tempo de preenchimento capilar pode estar lento (> 2 segundos) (OLIVEIRA et al., 2015). A hipoperfusão tecidual pode levar a alterações do estado mental e outros sinais podem surgir dependendo da causa do choque (FELICE et al., 2011).

O diagnóstico é observado por meio dos sinais clínicos, contudo, diversos achados são inespecíficos e, por isso, na análise do choque hipovolêmico, os parâmetros de pressão arterial média, débito cardíaco, pressão venosa central, hematócrito e lactato plasmático devem ser considerados. Durante a anamnese é importante verificar a ocorrência de hemorragia, vômito, diarreia, acidente traumático ou se foi administrado algum fármaco e o período de apresentação dos sinais. A confirmação do diagnóstico deverá ser ágil, simultânea à ressuscitação cardiopulmonar e procedimentos emergenciais (OLIVEIRA et al., 2015).

Os exames laboratoriais contribuem para identificar a causa do choque e falência dos órgãos alvo. Os testes disponíveis são: ureia, creatinina, eletrólitos, função hepática, amilase, lipase, coagulação, enzimas cardíacas, gasometria arterial e níveis de lactato. O choque por hemorragia aguda ocorre em poucas horas e por isso o diagnóstico e tratamento precisam ser rápidos, diferente dos casos de perda de hidroeletrólitos por desidratação, onde o quadro se desenvolve em dias (OLIVEIRA et al., 2015).

A intervenção terapêutica deverá restabelecer a volemia e a função do coração, corrigindo assim, a hipóxia tecidual (OLIVEIRA et al., 2015; RAISER, 2008). Além das medidas comuns de tratamento, no choque hemorrágico a contenção da hemorragia é crucial, de modo que intervenções cirúrgicas poderão ser realizadas. A terapia anti-hemorrágica poderá utilizar transfusões de sangue e/ou plasma (RAISER, 2008). Soluções cristaloide e, principalmente, soluções hipertônicas à base de cloreto de sódio (NaCl 7,5 %) poderão ser

utilizadas com a função de assegurar a hemodinâmica (BENESI; KOGIKA, 2011). Além disso, as soluções hipertônicas salinas são seguras quando usadas na fase inicial do choque hemorrágico (MOTAHARINIA et al., 2015).

Em ratos usados como modelos experimentais, a utilização de hidrocortisona na dose de 6 mg/kg via intravenosa demonstrou ação protetora com diminuição de lesões teciduais no intestino delgado e melhoramento dos níveis de pressão arterial média e parâmetros gasométricos (TAVARES et al., 2017). O resveratrol demonstrou ser um potente adjuvante das vias antioxidante e anti-inflamatória no tratamento para o choque hemorrágico. Em pré-ensaios clínicos de ressuscitação ocorreram melhoras significativas da função celular e sobrevida, contudo, a dose e período de administração não estão totalmente ajustados, necessitando mais estudos (SIMS; BAUR, 2017).

3.2 CHOQUE OBSTRUTIVO

É a síndrome caracterizada pelo comprometimento da função circulatória consequente a uma obstrução mecânica do débito cardíaco (RAISER, 2008), constrição dos vasos de maior calibre ou até mesmo do coração (MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014), impedindo ou restringindo o retorno venoso e levando à hipoperfusão dos tecidos (RAISER, 2008).

A fisiopatogenia do choque obstrutivo é explicada por meio de fatores que causam interferência no preenchimento ou esvaziamento do coração ou dos vasos de maior calibre. O impedimento ou restrição do retorno venoso pode ocorrer em casos de tromboembolismo pulmonar, tamponamento cardíaco por trauma ou infecção, ou também por compressão da veia cava como sucede em casos de elevação da pressão intratorácica, levando a um pneumotórax hipertensivo, efusões pleurais, ruptura de diafragma e síndrome vólvulo-dilatação gástrica (RAISER, 2008).

Os sinais de hipotensão, hipóxia, oligúria, estado mental alterado e preenchimento capilar aumentado (> 2 segundos) podem ocorrer. No entanto, são sinais mais sugestivos de choque obstrutivo a insuficiência respiratória, o timpanismo e a percussão alterada indicando pneumotórax. Bulhas cardíacas abafadas, taquicardia e estase jugular indicam tamponamento cardíaco. Outros sinais também podem estar presentes, dependendo da causa inicial de base (ROHR; NICODEM; CASTRO, 2014).

O diagnóstico será realizado a partir da anamnese, exame físico do paciente e observação dos sinais clínicos (FELICE et al., 2011). Esta síndrome é considerada uma emergência, sendo importante reconhecer precocemente seus sinais para intervir de maneira a

restabelecer a função cardíaca do paciente, corrigindo assim, a hipóxia tecidual gerada. O tratamento deve ser voltado para retirada das causas que levaram a essa síndrome, e restabelecimento da fisiologia que foi modificada. É relevante considerar o baixo volume circulatório, objetivando restaurar a circulação vascular, pela correção da perfusão tecidual através da reposição de líquidos e eletrólitos e também, principalmente, realizar a desobstrução. Na maioria dos casos é necessário fazer intervenção cirúrgica o mais rápido possível (MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014).

3.3 CHOQUE VASCULOGÊNICO OU DISTRIBUTIVO

Este tipo de choque, diferentemente do hipovolêmico, não se apresenta com perda do volume sanguíneo circulante no organismo, mas se relaciona com a vasculatura e a distribuição sanguínea. No choque distributivo ocorre vasodilatação periférica generalizada derivada da incapacidade da musculatura lisa dos vasos de manter o tônus mínimo de contração. Como consequência tem-se hipovolemia relativa com comprometimento do fornecimento normal de oxigênio para órgãos e tecidos e início de outros processos derivados desse desequilíbrio hemodinâmico. A diminuição da resistência periférica advém de motivos diversos que se reúnem para a classificação deste tipo de afecção circulatória em três subtipos: choque neurogênico, choque anafilático e choque séptico (LAFORCADE; SILVERSTEIN, 2015; MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014).

3.3.1 Choque neurogênico

Este subtipo se caracteriza pela perda repentina do tônus vascular em função de um distúrbio na comunicação do sistema nervoso central com áreas periféricas do organismo. Como consequências sistêmicas, a perda do tônus vascular resulta em dilatação arteriolar e vênular, subsequente queda de pressão arteriovenosa, diminuição de retorno venoso e hipóxia tecidual, com início de processos descompensatórios generalizados (LAFORCADE; SILVERSTEIN, 2015; MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014).

O choque neurogênico, também designado como paralisia vasomotora, ocorre por injúria no centro vasomotor central. Tal acometimento nervoso pode advir de situações como traumatismo de medula espinal, excessiva depressão vasomotora (processos de anestesia geral profunda), anestesia direcionada ao sistema nervoso central e uso de fármacos depressores do sistema nervoso (MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014; RAISER, 2008).

Os animais apresentam brusca hipotensão (consequente à vasodilatação periférica) e bradicardia, uma vez que os estímulos nervosos simpáticos para o coração também estão comprometidos. Este comprometimento pode levar ao agravamento rápido da situação clínica do paciente devido à incapacidade de ativação de mecanismo compensatório cardíaco. Outros sinais como taquipneia, temperatura corporal normal (diferente do choque hipovolêmico em que ocorre hipotermia), consciência em alerta, arreflexia e dor também poderão ser observados (CARLOTTI, 2012; ROQUE et al., 2013).

A pressão sanguínea mantida próxima de 35 mmHg por cerca de 2 horas desencadeia lesão irreversível no sistema nervoso central, com consequências inestimáveis ao organismo. Quanto ao coração, caso a pressão arterial se mantenha abaixo de 70 mmHg, haverá diminuição de fluxo coronariano e comprometimento circulatório advindo de motivo cardíaco, ou seja, o paciente poderá desenvolver uma patologia cardíaca secundária ao choque neurogênico, o que agravará o quadro do mesmo e dificultará ainda mais a sua recuperação (RAISER, 2008).

O pâncreas, quando submetido à isquemia, libera enzimas na circulação que induzirão a formação de compostos ativos tóxicos. Estes diminuirão o débito cardíaco e prejudicarão o sistema fagocítico-mononuclear. Tal processo deixará o animal vulnerável às endotoxinas produzidas pelas bactérias do trato digestivo, além de outras possíveis infecções. Os rins, quando submetidos à hipoperfusão por tempo prolongado, sofrem lesão nos túbulos renais com desenvolvimento de insuficiência renal. Cães e gatos, porém, raramente chegam a desenvolver insuficiência renal, pois vêm a óbito antes, por lesões em outros órgãos (DOURADO, 2010; FELICE et al., 2011; RAISER, 2008; RICHARD; WILCOX, 2014).

A hipóxia celular diminui quase totalmente a produção energética da célula, culminando no acúmulo de subprodutos tóxicos e acidose. A célula também cessa os mecanismos de transporte transmembrana, resultando em alteração da permeabilidade, edema, hipercalemia e consequente necrose. Um órgão que apresente grande quantidade de células afuncionais sofre falência, piorando a condição do animal em choque (RAISER, 2008).

Na terapêutica do animal em choque neurogênico podem ser empregadas práticas de tratamento comuns, de acordo com a necessidade, porém, especificamente para este quadro, o fármaco de escolha será a noradrenalina, cuja ação ocorre predominantemente sobre α-adrenoreceptores, corrigindo a hipotensão e normalizando a hemodinâmica. O protocolo de infusão da noradrenalina poderá iniciar com taxa de 0,05 µg/kg/min com observação dos efeitos surtidos em 15 minutos. Caso não haja resposta satisfatória quanto à regulação da pressão arterial, a dose poderá ser aumentada até 1 µg/kg/min, de forma progressiva, com monitoração constante dos parâmetros vitais do paciente e interrupção da infusão deste vasopressor assim

que a pressão arterial normalizar, a fim de evitar a excessiva vasoconstrição arterial, principalmente em rins e mesentério (RONCHI, 2018).

3.3.2 Choque Séptico

O choque séptico decorre da resposta inflamatória exacerbada a determinada infecção de alta carga ou alta virulência, seja por bactérias ou suas toxinas, ou eventualmente, outros agentes, como fungos, protozoários e vírus (CARREIRA; NUNES, 2015; CORREA et al., 2015; RHODES et al., 2017). Neste caso, há supressão de mecanismos inibitórios da inflamação, permitindo que mediadores inflamatórios se acumulem e atuem sobre a musculatura lisa, com efeito vasodilatador. Simultaneamente, é desencadeada hipovolemia, vasodilatação, disfunção miocárdica e obstrução microvascular. Por hipóxia, a produção celular de ATP por via aeróbica é reduzida e as células teciduais entram em apoptose (CALDEIRA FILHO; WESTPHAL, 2010; SALOMÃO; PETRONILHO; RITTER, 2014). Desse modo, se estabelece a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), cuja principal causa é a sepse (WAXMAN, 2020).

Na SRIS, os pulmões são acometidos por comprometimento da barreira alveolocapilar, que permite a entrada de citocinas e proteínas, causando danos alveolares e inativação do surfactante (BARBOSA et al., 2016). O trato gastrointestinal sofre lesão isquêmica, com elevada permeabilidade de mucosa e migração bacteriana, desencadeando, por exemplo, peritonite séptica (CORTELLINI; SETH; KELLETT-GREGORY, 2015; CULP et al., 2009). Ocorre ainda a perda de função e necrose de enterócitos, com alterações no peristaltismo e retardo na progressão da nutrição enteral (AZEVEDO, 2014). Devido à disfunção dos túbulos renais, há oligúria progressiva e elevação da creatinina, levando frequentemente à insuficiência renal aguda e a um prognóstico desfavorável (CHACAR et al., 2014).

Quanto ao diagnóstico do choque séptico, o relato do tutor é parte importante, junto à observação de sinais clínicos ao exame físico, como taquicardia, taquipneia, hipertermia, mucosas congestas e leucocitose; ou bradicardia, dispneia, hipotermia, mucosas hipocoradas e leucopenia (CHACAR et al., 2014). Essa variação ocorre porque o choque séptico divide-se em duas fases: hiperdinâmica e hipodinâmica, sendo esta consequência da primeira (CARREIRA; NUNES, 2015). Devido à complacência pulmonar limitada, os gatos ainda podem sofrer de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo, agravando o quadro (CHACAR et al., 2014).

Observa-se também, acrescidos à análise das manifestações clínicas, os sinais biológicos propostos pelo Sistema de Pré-disposição, Infecção, Resposta e Disfunção Orgânica

(PIRO), que englobam, segundo Farah et al. (2009), sinais de inflamação, como a concentração aumentada de procalcitonina ou proteína C reativa; alteração da perfusão tecidual, a exemplo da diminuição de débito urinário; e disfunção orgânica, constatada pela trombocitopenia e aumento de ureia, por exemplo. Sobre o fator infecção da PIRO, deve-se considerar a origem, grau, virulência do patógeno e sua carga no paciente. Ademais, o grau de disfunção orgânica pode ser classificado, ainda, a partir da presença ou não de insuficiência renal aguda e síndrome da angústia respiratória aguda e avaliação sequencial de falência de órgãos (SOFA) (FARAH et al., 2009; FREITAS et al., 2014).

O diagnóstico é dado precisamente somente após a estabilização do paciente, quando é possível avaliar aspectos como a hipovolemia e vasoplegia causadas pelo excesso de óxido nítrico. Deve-se, ainda, verificar os níveis séricos de glicose e cortisol, que podem estar aumentados devido a gliconeogênese hepática e a alta produção de receptores adrenérgicos (CHACAR et al., 2014; HIROTA et al., 2013)

Dado caráter emergencial da sepse, a correção volêmica é a primeira terapia de relevância para melhora do paciente (HIROTA et al., 2013). Aqui vale ressaltar que soluções cristaloides, balanceadas ou não, são a escolha mais aconselhável. Em casos de grande quantidade de fluido necessária, as soluções hiponcóticas de albumina são alternativas viáveis. A solução coloidal sintética hidroxietilamido é contraindicada nesse tipo de choque em função de seus efeitos colaterais (CORREA et al., 2015).

Entre as seis e 24 horas após o diagnóstico, a infusão contínua de insulina com dose inicial de 0,05 UI/kg/h auxiliará nos casos de hiperglicemia superior a 250 mg/dL em gatos e 180 mg/dL para cães (BARBOSA et al., 2016; CHACAR et al., 2014). Ademais, realiza-se ventilação mecânica em quadros agudos de lesão pulmonar ou Síndrome do Desconforto Respiratório Sistêmico (SDRS). A partir de 48 horas se realiza manejo nutricional trófico, via oral ou enteral. À medida da tolerância do animal é possível avançar com suplementação (BARBOSA et al., 2016).

Quanto ao uso de corticoides, Carreira e Nunes (2015) contrapõem os efeitos positivos dos glicocorticoides, como a melhora na microcirculação, benefício ao metabolismo de ácido lático e redução da liberação de histamina; às desvantagens do seu uso, como ulceração gastrointestinal e a susceptibilidade ao risco de novas infeções. O tratamento com cortisona é associado à melhora da fisiologia pulmonar em quadros de sepse associada à SDRS (TONGYOO et al., 2016).

Em se tratando de sepse, fica evidente a necessidade de eliminar o foco infeccioso, sendo recomendada a realização de cultura e antibiograma. No entanto, dado caráter emergencial do

quadro, é necessário estabelecer um tratamento provisório. Para este, tem-se a via intravenosa como ideal para administração (CARREIRA; NUNES, 2015). Dentre as opções protocoladas, tem-se a associação de enrofloxacina e ampicilina, recomendada somente para cães, dada elevada incidência de degeneração de retina e cegueira em gatos medicados com enrofloxacina (CHACAR et al., 2014). O uso de cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração é uma opção viável. A adição de metronidazol é feita no intuito de atingir também os microrganismos de metabolismo anaeróbico. A associação de betalactâmicos a aminoglicosídeos ou fluorquinolona ou a um macrolídeo, no prazo máximo de 3 a 5 dias, também pode ser utilizada até que se estabeleça o antibiótico adequado (BARBOSA et al., 2016).

Com a obtenção dos resultados da cultura e antibiograma, é possível estabelecer uma nova antibioticoterapia, mais adequada contra o agente infeccioso presente (CARREIRA; NUNES, 2015). A partir de então, o tempo máximo de tratamento deve ser de 7 a 10 dias, a menos que seja observada lentidão na resposta, imunossupressão, infecção por vírus, fungos ou *Staphylococcus aureus* (BARBOSA et al., 2016).

3.3.3 Choque Anafilático

É definido como uma resposta de hipersensibilidade tipo I, mediada por IgE, ou ainda, resposta citotrópica. Representa um exacerbado quadro alérgico, resultante de interações sequenciais entre alérgeno, IgE, mastócitos e basófilos que sintetizam e liberam mediadores químicos (PINTO; RATO, 2015). A anafilaxia ocorre quando, ao entrar em contato com substâncias, como fármacos, picadas de insetos e répteis, às quais são alergênicas para o animal, o organismo responde liberando mediadores como leucotrienos e histaminas, através da desgranulação de mastócitos. Estes atuam sobre os vasos sanguíneos e musculatura lisa, causando vasodilatação periférica, com redução de retorno venoso e da resistência vascular, bem como maior permeabilidade vascular. Dessa forma, constituintes séricos, como o plasma e as proteínas, extravasam para o espaço intersticial (MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014; PINTO; RATO, 2015).

Acidentes ofídicos em caninos, por exemplo, evoluem geralmente para edema submandibular acentuado, sangramento e hematoma na região próxima à lesão, além da coloração escura de urina (MICHAELSEN et al., 2013). Quando decorrente de proteínas plasmocitárias por transfusão sanguínea, cursa com pulso fraco, mucosas pálidas, angioedema, urticária, ascite, edema pulmonar e efusão pleural. Na reação leucocitária e plaquetária ocorre, principalmente, hipertermia e trombocitopenia. Por outro lado, na reação eritrocitária por

incompatibilidade sanguínea há hemoglobinúria e hemoglobinemia, hipertermia, tremores musculares, vocalização, decúbito, dentre outros (LACERDA, 2005).

De modo mais geral, os sinais mais comuns englobam: (1) os cutâneos, com urticária, prurido, eritema e angioedema; (2) os respiratórios, com taquipneia ou broncoespasmo, crepitação e tosse; (3) os cardiovasculares, incluindo hipotensão, taquicardia, arritmia e parada cardíaca; e (4) os digestórios, com vômito, náuseas, diarreia hemorrágica e congestão das vísceras. A definir por espécies, têm-se o fígado, estômago e intestinos como locais primários de acometimento em cães; enquanto gatos apresentam maior dano nos pulmões, sendo também característico intenso prurido de face e cabeça, vômito, sialorreia e déficit de coordenação (PINTO; RATO, 2015; THAMM; VAIL, 2007).

O diagnóstico é geralmente dado pelo relato do tutor ou estabelecido em anamnese, após estabilização do animal, associando-se aos sinais clínicos percebidos pelo profissional veterinário (PINTO; RATO, 2015; THAMM; VAIL, 2007). É importante ressaltar os diagnósticos diferenciais de choque anafilático, como patologias relacionadas ao trato respiratório inferior, obstrução do trato respiratório superior, mastocitose sistêmica, insuficiência cardíaca congestiva e graves quadros asmáticos (PINTO; RATO, 2015).

Quanto ao tratamento, é dado suporte à vida, conforme descrito inicialmente no capítulo. Posteriormente, é administrado antialérgico, sendo epinefrina a 0,01 mg/kg, a 0,00 1mg/kg ou um anti-histamínico, sendo que a escolha depende da gravidade do quadro, seja hiperagudo, severo ou moderado, respectivamente. O anti-histamínico aplicado pode ser, por exemplo, a difenidramina nos intervalos de dose de 1-4 mg/kg para cães e 5-2 mg/kg para gatos (PINTO; RATO, 2015).

Em casos específicos, como o acidente ofídico, o uso de uma ampola de soro antiofídico polivalente liofilizado na dose de 2 mL/kg, diluída em solução glicosada 5%, associado ao uso de dexametasona (0,5 mg/kg), cloridrato de tramadol (3 mg/kg) e ampicilina (22 mg/kg) foi efetivo como terapêutica (MICHAELSEN et al., 2013).

Quanto aos acidentes que envolvem abelhas, Cowel e Cowel (1995) indicam, para picadas únicas, compressas geladas nos locais e anti-histamínicos. Para picadas múltiplas, o uso de coirticosteroides como succinato de predinisolona sódica (10 mg/kg IV) associado à administração oral de predinisolona (1 mg/kg, duas vezes ao dia, por 3 a 5 dias). Em acidentes escorpiônicos, se administra 5 ml de soro hiperimune para cada 2 mg de veneno, via intravenosa, emergencialmente (AVILA et al., 2004; CARDOSO et al., 2004).

Em transfusões sanguíneas, recomenda-se tratamento prévio a novas transfusões, com anti-histamínicos e corticosteroides, associado à alta velocidade de transfusão para animais com

quadros de reação às proteínas plasmáticas. Para reações alérgicas por incompatibilidade de leucócitos e plaquetas, a prevenção por anti-histamínicos e tratamento pré-transfusional não é eficaz. No entanto, sugere-se o uso de corticosteroides ou anti-inflamatórios não esteroidais prévios à transfusão a fim de evitar o quadro febril. Caso ocorra a resposta humoral contra as próprias plaquetas, sendo comum em cães, a imunossupressão utilizando prednisolona demonstra-se eficaz na recuperação do animal. A dosagem imunossupressora é de 2 mg/kg em cães. Quando há incompatibilidade sanguínea, nem mesmo os corticosteroides são eficazes na prevenção à reação (LACERDA, 2005).

De modo mais geral, os corticoides devem ser administrados via intravenosa associados à fluidoterapia, tendo por opção o succinato sódico de prednisolona na dose de 2 mg/kg por 10 minutos, a metilpredinisolona, na mesma dose e tempo de administração, ou o fosfato sódico de dexametasona na dose de 0,5 mg/kg. A dispneia resultante do quadro deve ser tratada conforme a causa. Quando por broncoconstrição, é indicado o uso de salbutanol 4 µg/kg por via intravenosa ou terbutalina 0,01 mg/kg subcutânea, enquanto a dispneia por edema pulmonar requer administração intravenosa de furosemida 0,5 mg/kg (PINTO; RATO, 2015).

3.4 CHOQUE CARDIOGÊNICO

Advém de enorme dano ao funcionamento cardíaco que promove falha na dinâmica circulatória e resulta em hipoperfusão tecidual sistêmica com distribuição deficiente de energia e oxigênio para as células (LAFORCADE; SILVERSTEIN, 2015). A disfunção cardíaca será a causa primária podendo apresentar duas origens: intrínseca e extrínseca (KNOBEL, 1999; RAISER, 2008).

Quando o choque cardiogênico tem origem intrínseca, a disfunção cardíaca que causou a patologia ocorreu por alterações na estrutura cardíaca ou distúrbios na condução sanguínea no coração. As alterações na estrutura serão o rompimento de cordas tendíneas e as cardiomiopatias, e os distúrbios na condução incluem alterações de ritmo cardíaco (bradiarritmia e taquiarritmia), situação de fibrilação e bloqueio cardíaco, seja parcial ou total (LAFORCADE; SILVERSTEIN, 2015; RAISER, 2008). Ao passo que na origem extrínseca, a disfunção cardíaca será secundária a outro processo, que poderá ser fisiológico ou externo ao organismo. Como exemplos tem-se a depressão do miocárdio, seja por alterações eletrolíticas e de ácido-base, ou via intoxicação medicamentosa, ou ainda via fator depressor do miocárdio (FDM) produzido pelo pâncreas em situação de isquemia (RAISER, 2008). A oclusão de

artérias coronarianas também poderá levar à perda de massa muscular cardíaca, o que também é um fator desencadeante de choque cardiogênico (KNOBEL, 1999).

Independente da origem da disfunção cardíaca, a mesma gerará efeitos no organismo do paciente, como a hipotensão arterial, oligúria, mucosas pálidas ou cianóticas, tosse, parâmetros cardíacos descontrolados, além de apresentação das extremidades frias, decorrentes da diminuição de perfusão sanguínea em áreas periféricas. O paciente poderá apresentar ainda, alteração nos níveis da consciência (KNOBEL, 1999).

O diagnóstico se fará a partir de exame clínico detalhado com a mensuração de todos os parâmetros cardíacos (FEITOSA, 2008). Nos exames laboratoriais serão evidenciados hiperlactatemia, acidose metabólica e azotemia. A realização de exame radiográfico e ultrassonográfico podem evidenciar possíveis patologias cardíacas como cardiomegalia, efusão pericárdica, edema pulmonar, miocardiopatia e valvulopatias. O eletrocardiograma auxilia na detecção de arritmias (NAGIB, 2017).

O atendimento inicial de suporte à vida deve ser fornecido, além de que neste tipo de choque existe a necessidade de o tratamento ser realizado com o animal sob internação, uma vez que poderão acontecer paradas cardíacas (CARLOTTI, 2012; RAISER, 2008). Inotrópicos poderão ser utilizados para melhora da força de contração, como dobutamina (2 -10 µg/kg/min) em infusão inicial de 5 µg/kg/min e monitoração do parâmetro eletrocardiográfico do paciente para constatação de possíveis distúrbios do ritmo em resposta. Nos casos de hipotensão grave refratária a noradrenalina, na dosagem de 1 µg/kg/min, pode ser associada a dobutamina ou ao pimobendan (0,5 mg/kg/VO SID) (NAGIB, 2017). Alternativamente, ainda poderá ser empregada dopamina (1-10 µg/kg/min), por via intravenosa (KNOBEL, 1999).

Em gatos apresentando miocardiopatia hipertrófica a utilização de um β-bloqueador ou bloqueador do canal de cálcio auxiliará na resolução do quadro. Este tipo de medicamento, porém, é contraindicado quando a força de contração está reduzida (TILLEY; SMITH JR, 2008).

Cães com arritmias ventriculares podem necessitar de terapia antiarrítmica. O cloridrato de lidocaína participa do protocolo com dose inicial de 2 mg/kg até 50 µg/kg, via intravenosa, com efeitos anestésico, analgésico e antiarrítmico. Em gatos a recomendação é 1/10 da dose usada para cães, em função dos efeitos nervosos (TILLEY; SMITH JR., 2008). É um fármaco utilizado de forma preventiva à fibrilação e arritmia cardíaca, principalmente as de cunho supraventricular (GOLZARI et al., 2014; RAISER, 2008).

Eventualmente a terapia diurética também será relevante em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva direita, mas, em casos onde existe a efusão pericárdica esta terapia é

contraindicada. A terapia vasodilatadora poderá ser realizada para melhorar o débito cardíaco pela redução de pós-carga, entretanto, a pressão sanguínea deve ser monitorada frequentemente. O enalapril na dose de 0,25 a 0,5 mg/kg, via oral ou o nitroprussiato sódico a 5-10 µg/kg/min, via intravenosa serão os medicamentos de escolha (RAISER, 2008).

4 SINAIS DE RECUPERAÇÃO

Os sinais de recuperação do paciente decorrerão por meio da restauração dos parâmetros clínicos, principalmente a reperfusão capilar; frequência cardíaca, pressão arterial, pulso periférico, débito urinário, temperatura corporal e estado de consciência. O exame complementar para níveis de lactato e saturação de oxigênio no sangue venoso e arterial possibilita a confirmação da recuperação clínica. Entretanto, em alguns choques o monitoramento e/ou internação do animal deve ser mantido de 24 a 48 horas após a melhora clínica, visto que em casos de hipotensão significativa, a taxa de reincidência é alta (CORREA et al., 2015; RAISER, 2008).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como consideração final para o capítulo foi elaborada uma tabela (TABELA 1) que resume todos os choques abordados, bem como suas características a serem observadas, e o tratamento.

Tabela 1 – Compilação dos tipos de choques, características e tratamento.

Choque		Características	Tratamento		
			Específico	**Suporte**	**Uso Comum**
Hipovolêmico		Perda volêmica por hemorragia, desidratação, perda plasmática e de forma traumática (FELICE et al., 2011; MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014).	Contenção da perda de volume	Estabilização do animal (reanimação ou sustentação da vida)	Manutenção da pressão arterial
Obstrutivo		Obstrução mecânica do débito cardíaco ou compressão dos grandes vasos e do coração (MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014; RAISER, 2008).	Desobstrução	Verificação, desobstrução e proteção das vias aéreas	Ação antioxidante (lesões celulares)
Vasculogênico ou Distributivo	*Neurogênico*	Comprometimento da comunicação do sistema nervoso central com áreas periféricas do organismo (MOURAO-JUNIOR; SOUZA, 2014).	Ação predominante sobre noradrenalina	Ventilação e oxigenação	Correção da acidose metabólica
	Séptico	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica associada aos sinais de choque (RHODES et al., 2017).	Eliminação do foco infeccioso (antibioticoterapia)	Manutenção e correção da volemia (compressões torácicas e fluidoterapia)	Antibioticoterapia profilática
	Anafilático	Exacerbado quadro alérgico (PINTO; RATO, 2015).	Antialérgicos, anti-histamínicos e soros específicos		
Cardiogênico		Causa primária: disfunção cardíaca. Enorme dano ao funcionamento cardíaco (LAFORCADE; SILVERSTEIN, 2015; RAISER, 2008).	Inotrópicos e antiarrítmicos	Exame físico simultâneo	

6 REFERÊNCIAS

AN, N. et al. Pretreatment of mice with rifampicin prolongs survival of endotoxic shock by modulating the levels of inflammatory cytokines. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, New York, v. 30, n. 3, p. 437-446, 2008.

ATECA, L. B.; DOMBROWSKI, S. C.; SILVERSTEIN, D. C. Survival analysis of critically ill dogs with hypotension with or without hyperlactatemia: 67 cases (2006-2011). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 246, n. 1, p. 100-104, 2015.

AVILA, R. A. M. de. et al. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. **Toxicon**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 233-241, 2004.

AZEVEDO, R. Disfunção gastrointestinal aguda na sepse. In: AZEVEDO, L. C. P. de.; MACHADO, F. R. **Sepse**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2014. p. 30-36.

.

BARBOSA, B. C. et al. Fisiopatologia e terapia do cão com sepse: revisão. **Pubvet**, Londrina, v. 10, n. 1, p. 13-20, 2016.

BENESI, F. J.; KOGIKA, M. M. Fluidoterapia. In: SPINOSA, H. de. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 756-757.

BOIVIN, A. et al. Docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, improves septic shock-induced arterial dysfunction in rats. **Plos One**, San Francisco, v. 12, n. 12, p. 1-17, 2017.

CALDEIRA FILHO, M.; WESTPHAL, G. A. Fisiopatologia da sepse e do choque séptico. In: GUIMARÃES, H. P.; LOPES, R. D.; LOPES, A. C. **Tratado de medicina de urgência, emergência, pronto-socorro e UTI**. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 1211-1225.

CARDOSO, M. J. L. et al. Envenomation by scorpion in dog – case report. **Journal Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 98-105, 2004.

CARLOTTI, A. P. de C. P. Choque em crianças. **Medicina (Ribeirão Preto)**, Ribeirão Preto, v. 45, n. 2, p. 197-207, 2012.

CARREIRA, P.; NUNES, S. Choque séptico. In: REIS, J. et al. **Protocolos clínicos: diagnóstico e intervenção em clínica de animais de companhia**. Évora: Universidade de Évora, 2015. p. 15-20.

CHACAR, F. C. et al. Sepse em felinos. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 64-76, 2014.

CORREA, T. D. et al. Fluidoterapia para a ressuscitação no choque séptico: qual tipo de fluido deve ser utilizado? **Einstein**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 462-468, 2015.

CORTELLINI, S.; SETH, M.; KELLETT-GREGORY, L. M. Plasma lactate concentrations in septic peritonitis: a retrospective study of 83 dogs (2007-2012). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, Malden, v. 25, n. 3, p. 388–395, 2015.

COWEL, A. K.; COWEL, L. R. Management of bee e other Himenóptera sting. In: BONAGURA, J. D.; KIRK, R. W. **Kirk's current veterinary therapy**: small animal practice. 12. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995. p. 464-469.

CULP, W. T. N. et al. Primary bacterial peritonitis in dogs and cats: 24 cases (1990-2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 234, n. 7, p. 906-913, 2009.

DOURADO, A. J. S. **Estudo de variações de gasometria venosa e indicadores de perfusão em canídeos em síndrome choque**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

FARAH, L. S. C. et al. Entendendo o conceito PIRO: da teoria à prática clínica – Parte 1. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 4, p. 425-431, 2009.

FEITOSA, F. L. Exame físico geral ou de rotina. In: _____. **Semiologia veterinária**: a arte do diagnóstico. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 77-102.

FELICE, C. D. et al. Choque: diagnóstico e tratamento na emergência. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 55, n. 2, p. 179-196, 2011.

FLETCHER, D. J.; BOLLER, M. Updates in small animal cardiopulmonary resuscitation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 43, n. 4, p. 971-987, 2013.

FREITAS, G. R. C. de. et al. Relação entre o sequential organ failure assessment (SOFA) e a pressão intra-abdominal em unidade de tratamento intensivo. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, Curitiba, v. 27, n. 4, p. 256-260, 2014.

GOLZARI, S. E. et al. Lidocaine and pain management in the emergency department: a review article. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, Secaucus, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2014.

HIROTA, I. N. et al. Reposição volêmica em cães portadores de sepse grave: revisão de literatura. **Nucleus Animalium**, Ituverava, v. 5, n. 1, p. 79-90, 2013.

HOPPER, K.; BORCHERS, A.; EPSTEIN, S. E. Acid base, electrolyte, glucose, and lactate values during cardiopulmonary resuscitation in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, Malden, v. 24, n. 2, p. 208-214, 2014.

KNOBEL, E. Choque cardiogênico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 405-413, 1999.

LACERDA, L. de. A. Transfusão sanguínea em veterinária: desafios a vencer. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; SANTOS, A. P. dos. SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2, 2005, Porto Alegre. **Anais do II**

Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil. Porto Alegre, 2005, p. 62-68.

LAFORCADE, A.; SILVERSTEIN, D. C. Shock. In: SILVERSTEIN, D. C.; HOPPER, K. S**mall animal critical care medicine**. 2. ed. Philadelphia: Elsevier, 2015. p. 26-30.

MAIER, G. W. et al. The physiology of external cardiac massage: high-impulse cardiopulmonary resuscitation. **Circulation**, Dallas, v. 70, n. 1, p. 86-101, 1984.

MAZZAFERRO, E.; POWELL, L. L. Fluid therapy for the emergent small animal patient: crystalloids, colloids, and albumin products. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 43, n. 4, p. 721-734, 2013.

MICHAELSEN, R. et al. Acidente ofídico em um cão - relato de caso. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 13, p. 57-58, 2013.

MORGAZ, J. et al. Evaluation of gastric and bladder tonometry as indicators of tissue perfusion in induced hypotension in dogs. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, Malden, v. 27, n. 5, p. 532-538, 2017.

MOURAO-JUNIOR, C. A.; SOUZA, L. S. de. Fisiopatologia do choque. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 40, n. 1 e 2, p. 73-78, 2014.

MOTAHARINIA, J. et al. Immunomodulatory effect of hypertonic saline in hemorrhagic shock. **Daru Journal of Pharmaceutical Sciences**, Tehran, v. 23, n. 1, p. 47-55, 2015.

NAGIB, M. G. **Choque cardiogênico em cães**: revisão de literatura. 2017. 44 f. Monografia (Bacharel em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

OLIVEIRA, T. C. et al. Choque hipovolêmico hemorrágico em cães - revisão de literatura. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, Umuarama, v. 2, n. 1, p. 53-65, 2015.

PINTO, I.; RATO, M. Choque anafilático. In: REIS, J. et al. **Protocolos clínicos**: diagnóstico e intervenção em clínica de animais de companhia. Évora: Universidade de Évora, 2015. p. 21-26.

RAISER, A. G. Choque. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 594-610.

RHODES, A. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. **Critical Care Medicine**, New York, v. 45, n. 3, p. 486-552, 2017.

RICHARD, J. B.; WILCOX, S. R. Diagnosis and management of shock in the emergency department. **Emergency Medicine Practice**, Norcross, v. 16, n. 3, p. 1-22, 2014.

ROHR, R. D.; NICODEM, M. A.; CASTRO, J. de C. Choque: princípios gerais de diagnóstico precoce e manejo inicial. **Acta médica**, Porto Alegre, v. 35, n. 8, p. 1-8, 2014.

RONCHI, S. J. **Norepinefrina, dopamina ou dobutamina em cães submetidos a hipotensão**. 2018. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.

ROQUE, V. et al. Disfunções autonómicas após lesão medular. **Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Física e de Reabilitação**, Lisboa, v. 24, n. 2, p. 43-51, 2013.

SALOMÃO, R.; PETRONILHO, F.; RITTER, C. Fisiopatologia da sepse. In: AZEVEDO, L. C. P.; MACHADO, F. R. **Sepse**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2014. p. 13-20.

SHEA, E. K.; DOMBROWSKI, S. C.; SILVERSTEIN, D. C. Survival analysis of hypotensive cats admitted to an intensive care unit with or without hyperlactatemia: 39 cases (2005-2011). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 250, n. 8, p. 887-893, 2017.

SIMS, C. A.; BAUR, J. A. The grapes and wrath: using resveratrol to treat the pathophysiology of hemorrhagic shock. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1403, n. 1, p. 70-81, 2017.

TAVARES, M. L. C. et al. Baixas doses de hidrocortisona possuem ação protetora no choque hemorrágico em ratos. **Pará Research Medical Journal**, Belém, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2017.

TELES, R.; LOURENÇO, J. Choque hipovolémico. In: REIS, J. et al. **Protocolos clínicos**: diagnósticos e intervenção em clínica de animais de companhia. Évora: Universidade de Évora, 2015. p. 27-28.

THAMM, D. H.; VAIL, D. M. Aftershocks of cancer chemotherapy: managing adverse effects. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2007.

TILLEY, L. P.; SMITH JR, F. W. K. **Consulta veterinária em 5 minutos – espécies canina e felina**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. p. 214-219.

TONGYOO, S. et al. Hydrocortisone treatment in early sepsis-associated acute respiratory distress syndrome: results of a randomized controlled trial. **Critical Care**, London, v. 20, n. 329, p. 1-11, 2016.

WAXMAN, C. **Recognizing, treating, and monitoring systemic inflammatory response syndrome and sepsis.** Today's Veterinary Nurse, 2020. Disponível em: <todaysveterinarynurse.com/articles/recognizing-treating-and-monitoring-systemic-inflammatory-response-syndrome-and-sepsis/>. Acesso em: 17 jul. 2020.

ZANCAN, R. G. **Fluidoterapia no choque hipovolêmico**. 2014. 29 f. Monografia (Especialidade em Cirurgia/Anestesiologia Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Residência Médico-Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

Formas farmacêuticas alternativas para uso na farmacoterapia veterinária

Renato Almeida Brambati[1]
Nubya Nascimento Costa[2]
Geanne Aparecida de Paula[3]
Sthefany Brito Salomão[4]
Alice Cristina Morgado Cassa[5]
Janaina Cecília Oliveira Villanova[6]

[1] UniversidadeFederal do Espírito Santo: e-mail: renato_brambatti@yahoo.com.br
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: nubyacosta@hotmail.com
[3] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: geannerabello@hotmail.com
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: sthefanybritosalomao@gmail.com
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: alicecriscassa@gmail.com
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: pharmacotecnia@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos um intenso aumento no número de animais vem sendo observado no país. Conforme dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET), o Brasil ocupa o terceiro lugar entre os países em população total de animais de estimação (*pet*). Hoje, o mercado pet representa 0,36% do produto interno bruto (PIB) brasileiro, com crescimento do faturamento em cerca de R$ 17 bilhões entre os anos de 2006 e 2018. O mercado inclui as atividades relacionados à oferta de produtos relacionados aos segmentos de alimentos (*pet food*), medicamentos (*pet vet*) e aos cuidados com saúde e higiene (*pet care*) (ABINPET, 2020). Diante deste cenário, se encontra em análise no Senado Federal, pela Comissão de Meio Ambiente, a proposta do marco regulatório dos animais de estimação, mediante Projeto de Lei número 6.590 de 2019, que visa reconhecer a importância dos animais para o ser humano e conferir segurança jurídica aos segmentos econômicos envolvidos no setor (BRASIL, 2019). Segundo o PL 6.590/2019, animais de estimação são:

> *"seres de senciência e sensibilidade, devendo ser protegidos contra maus-tratos, com plena condição de bem-estar. São destinações principais deles, entre outras: companhia, lazer, terapia, criação, guarda, trabalho, auxílio a pessoas com deficiência, esportes, participação em torneios e exposições, reprodução para melhoramento genético e trabalhos especiais"* (BRASIL, 2019).

Acompanhando as exigências do mercado pet, há uma crescente busca por formas farmacêuticas diferenciadas, com o objetivo de inovar as práticas farmacoterapêuticas no âmbito veterinário e aumentar a conveniência na administração dos medicamentos pelos tutores (SARTURI, 2017). Sendo assim, o presente capítulo abordará a importância das formas farmacêuticas no sucesso da farmacoterapia veterinária, bem como, apresentará formas farmacêuticas inovadoras para uso na clínica veterinária, uma vez que em capítulos anteriores foram abordadas as formas farmacêuticas convencionais que podem ser manipuladas.

2 PRODUTOS MANIPULADOS NA FARMACOTERAPIA VETERINÁRIA

O sucesso da farmacoterapia possui papel decisivo na recuperação ou manutenção da saúde do animal. Para que um fármaco possa exercer sua atividade terapêutica, é necessário que este seja liberado no organismo na concentração adequada e durante o tempo em que se deseja obter a resposta terapêutica. A quantidade de fármaco que atingirá o local de ação depende da dose administrada, da quantidade absorvida e dos parâmetros farmacocinéticos alcançados, tais

como velocidade de distribuição, metabolização, degradação e eliminação do fármaco pelo organismo (JULIANI, 2014; NICOLETTI; FUKUSHIMA, 2014). Contudo, tais parâmetros dependerão, intrinsecamente, da forma farmacêutica na qual o fármaco será incorporado e administrado, uma vez que o fármaco precisa ser liberado da forma farmacêutica para que as etapas farmacocinética e farmacodinâmica ocorram (VILLANOVA; GUEDES; SEVERI, 2014). A escolha da melhor forma farmacêutica para cada fármaco, por sua vez, depende das características físico-químicas do fármaco, da quantidade de fármaco a ser administrada, da ação esperada e da via de administração pretendida. Por fim, a escolha da forma farmacêutica deve levar em consideração, também, a aceitação do medicamento pelo animal, buscando ao máximo reduzir o estresse provocado durante a administração (BARBOSA, 2010; VILLANOVA; GUEDES; SEVERI, 2014).

É frequente na farmacoterapia veterinária, a prática da prescrição de medicamentos destinados ao uso humano para os animais, em função da existência de número limitado de produtos farmacêuticos de uso exclusivo em veterinária no que diz respeito tanto ao fármaco e sua dose, quanto à inexistência de formas farmacêuticas apropriadas para o uso animal. Eventualmente, pode ocorrer a administração de doses subterapêuticas ou tóxicas, podendo causar ineficácia e/ou falta de segurança para o tratamento (PACHALY et al., 2010; SHARMA; MACNEILL, 2009).

Por outro lado, é possível identificar nos últimos anos, aumento na busca por medicamentos veterinários que atendam as espécies de caninos, felinos e equinos (BIOMINAS, 2017). Ainda, a demanda por preparações magistrais vem experimentando aumento em função do crescimento populacional dos animais de estimação e pela crescente exigência dos tutores por produtos e serviços para a melhoria na qualidade de vida dos seus companheiros de estimação, em função da estreita relação de afetividade existente entre ambas as populações (CAPANEMA, 2007). É cada vez maior a busca por medicamentos e produtos de higiene e beleza de uso exclusivo na prática veterinária. No que diz respeito aos tratamentos de saúde, a personalização da farmacoterapia veterinária, requerendo protocolos farmacoterapêuticos individualizados, aumentam a procura pelo setor magistral, com a manipulação de formulações farmacêuticas convencionais e inovadoras, tornando a manipulação veterinária um diferencial no segmento *pet vet* e impactando, inclusive, economicamente no setor (LIMA et al., 2019).

As principais vantagens do produto veterinário manipulado consistem na possibilidade de individualização e adequação de doses e das formas farmacêuticas; diminuição do desperdício, uma vez que os produtos podem ser preparados em quantidade definida para a duração do tratamento; e, a possibilidade de aumentar a adesão ao tratamento mediante

adequação do paladar, formato e da textura dos produtos manipulados (LIMA et al., 2019; PAYNE-JOHNSON; MAITLAND; GOSSELLIN, 2007; SILVA, 2018). Outras vantagens são a possibilidade de seleção de excipientes de acordo com o histórico do animal, a associação de fármacos e a produção de formas farmacêuticas alternativas e inovadoras, diferentes daquelas disponíveis comercialmente (ALLEN, 2002).

3 FORMAS FARMACÊUTICAS NA FARMACOTERAPIA VETERINÁRIA

Formas farmacêuticas são definidas como as formas físicas nas quais os medicamentos são apresentados, permitindo a administração dos fármacos aos pacientes (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013). As formas farmacêuticas apresentam classificações consoantes as apresentações (líquidas, sólidas, semissólidas, plásticas e gasosas) e a liberação do fármaco (liberação imediata, sistema de liberação modificada e sistema de desempenho terapêutico avançado) (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Outra possível classificação, se baseia na disponibilidade das mesmas no mercado. Formas farmacêuticas comercialmente disponíveis podem ser chamadas de tradicionais (convencionais). Estas, são encontradas usualmente no mercado, podendo ser preparadas em escala industrial ou magistral. São exemplos, os diferentes tipos de grânulos, cápsulas, comprimidos, soluções, elixires, xaropes, suspensões, emulsões, cremes, pomadas, pastas, géis, supositórios, adesivos e aerossóis (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013). Contudo, formas farmacêuticas alternativas, são aquelas preparadas para atender à uma população ou prescrição específica, com o objetivo de assegurar a ingestão de toda a dose e a eficácia da farmacoterapia sendo, usualmente, manipuladas. São exemplos, as gomas medicamentosas, os biscoitos, os pirulitos, as pastas orais, os géis transdérmicos, as espumas, os tabletes orodispersíveis e os filmes de dissolução rápida (ALLEN, 2002) .

Uma vez que as formas farmacêuticas convencionais são amplamente discutidas e foram apresentadas em edição anterior do livro tópicos especiais em ciência animal, serão discutidas a seguir, as formas farmacêuticas consideradas alternativas para uso na farmacoterapia veterinária.

3.1 FILMES ORODISPERSÍVEIS

Filmes orodispersíveis (ODFs) ou bucodispersíveis (BDFs), também chamados de lâminas ou *strips*, são formas farmacêuticas que têm ganhado bastante destaque em função da sua conveniência na administração e boa aceitação (LEE et al., 2017). O filme é uma forma

farmacêutica sólida, preparada a partir de polímeros hidrossolúveis e/ou intumescíveis, destinados à administração pela via bucal, podendo ser preparada tanto em escala magistral, quanto em escala industrial, objetivando uso humano ou animal (VISSER, 2015). Os filmes se apresentam como películas flexíveis finas que, ao serem colocadas na cavidade bucal sobre a língua, paredes laterais ou palato do animal, são rapidamente hidratadas e dispersas ou dissolvidas pela saliva, com desintegração na mucosa bucal. Assim, a administração ocorre sem a necessidade de ingestão de água e deglutição, não apresentando o risco de asfixia para o animal e diminuindo as chances de serem facilmente cuspidos pelos mesmos. Além de reduzir o risco de asfixia, os ODFs não precisam ser mastigados, o que pode configurar vantagem para o sucesso da farmacoterapia veterinária (ARYA et al., 2010; HOFFMANN; BREITENBACH; BREITKREUTZ, 2011). A Figura 1 apresenta alguns exemplos de ODFs e suas embalagens.

Figura 1 – Imagens de filmes orodispersíveis em diferentes embalagens.
Fonte: Hoffmann, Breitenbach e Breitkreutz (2011).

Os ODFs podem ser opacos ou transparentes, coloridos ou não, e com a superfície lisa ou com grumos, desde que a textura seja aceitável e não pegajosa. Sua espessura pode variar entre 50 e 500 µm, com área superficial entre 1 e 20 cm^2, conforme a dose de fármaco e tamanho da cavidade bucal na qual será aplicado. Devem manter a sua forma plana, sendo necessários materiais de embalagem que ofereçam barreira contra a umidade. Podem ser utilizadas tanto embalagens multidoses, quanto unidoses, sendo essa última preferível a fim de evitar acidentes com overdose em função da adesão de um filme ao outro (HOFFMANN; BREITENBACH; BREITKREUTZ, 2011).

Uma das grandes vantagens dos filmes é a possibilidade de mascarar o sabor desagradável do fármaco através da adição de agentes flavorizantes na formulação. Além de possuir textura agradável na boca que melhora sua palatabilidade e os torna atraentes ao animal, contribuindo para a aceitação do medicamento e consequente sucesso da farmacoterapia. Entretanto, os ODFs não são a forma farmacêutica de escolha para veicular doses elevadas de fármaco ou fármacos de sabor muito amargo (SCARPA et al., 2017).

Apesar do grande número de trabalhos que tratam do desenvolvimento de ODFs para uso humano e do grande número de medicamentos aprovados e comercializados para esta população, os relatos acerca da existência de ODFs para uso na prática veterinária são escassos. Somente dois artigos encontrados abordam o uso de ODFs em veterinária. Trass et al. (2010) realizaram um estudo no qual avaliaram a aceitação de uma população de 90 gatos, por 3 diferentes veículos (cápsulas, solução oleosa e filmes orais finos), quando administradas uma vez ao dia, durante 14 dias. Os autores concluíram que a aceitação foi favorecida quando foram oferecidas tanto a solução oleosa quanto dos filmes, quando comparadas ao uso das cápsulas. Kumar et al. (2014) prepararam filmes contendo enrofloxacina em matriz de PVP, com vistas a obter uma preparação de uso oral na qual o fármaco fosse solúvel. O fármaco e o polímero foram solubilizados em metanol e foram obtidos filmes por secagem em temperatura ambiente. A pesquisa de sensibilidade microbiana *in vitro* demonstrou que cepas de micro-organismos gram-positivos e gram-negativos se mostraram sensíveis ao filme contendo enrofloxacina.

3.2 COMPRIMIDOS E TABLETES BUCODISPERSÍVEIS

Em muitas ocasiões, dada a dificuldade de administrar medicamentos pela via oral, o tutor lança mão da prática de triturar e misturar o medicamento nos alimentos e bebidas, com o intuito de mascarar o sabor do fármaco. Tal técnica apresenta limitações e pode, muitas vezes, levar à ingestão de doses subterapêuticas, uma vez que nem todo o alimento ou bebida serão ingeridos, resultando em ineficácia do tratamento (PAYNE-JOHNSON et al., 2006; PAYNE-JOHNSON; MAITLAND; GOSSELLIN, 2007; PETRY; FOURIE; WOLKEN, 2014). Neste cenário, assim como os ODFs, os comprimidos ou tabletes orodispersíveis se apresentam como alternativas para a administração de doses uniformes do fármaco, especialmente para animais com disfagia (YI, 2017). A Figura 2 traz imagem representativa de ODTs preparados para estudo realizado pelo grupo de pesquisa dos autores.

Sistemas bucodispersíveis são formas farmacêuticas sólidas orais que se desintegram rapidamente na cavidade bucal, liberando o fármaco que será deglutido juntamente com a saliva, objetivando ação sistêmica. Comprimidos, mini-comprimidos ou tabletes orodispersíveis (*orodispersible tablets* - ODTs) figuram entre as formas farmacêuticas baseadas nesta tecnologia disponíveis para aumento da biodisponibilidade de fármacos e da adesão de pacientes ao tratamento (BHARATHI et al., 2012).

Figura 2 – Imagem representativa dos tabletes.
Fonte: Lacerda (2020).

Comprimidos e tabletes orodispersíveis são, por vezes, confundidos. Entretanto, diferem no que diz respeito ao método de preparo. Enquanto os comprimidos, inclusive os orodispersíveis, são preparados em escala industrial, pelo método de compactação e compressão empregando compressoras, os tabletes orodispersíveis são obtidos em escala magistral por moldagem, empregando molde (tableteiro), no qual a massa úmida é pressionada (CHUNG et al., 2005).

A incorporação de edulcorantes e flavorizantes, fornecendo sensorial agradável ao paladar animal, é uma das principais vantagens dos ODTs, uma vez que as diferentes espécies têm preferência por determinados sabores (TIWARI; MITKARE; BHANGALE, 2014). A capacidade de desintegração e/ou dissolução da preparação na cavidade bucal, liberando o fármaco localmente, promove maior comodidade no processo de administração do medicamento, já que o animal não precisa engolir o produto. Ainda, pode contribuir para que o fármaco seja parcial ou totalmente absorvido para a circulação sistêmica pela vascularização da mucosa sublingual, evitando o efeito de primeira passagem e protegendo o fármaco de enzimas e do pH do trato gastrointestinal (GOSWAMI; JASTI; LI, 2008). No entanto, cabe ressaltar, que a forma farmacêutica pode ser engolida inteira pelo animal e o caminho a ser percorrido pelo medicamento será o mesmo de um sólido oral convencional. Portanto, estas formas farmacêuticas exigem delineamento farmacotécnico criterioso, visando obter as características ideais para que a absorção e/ou a liberação na mucosa bucal ocorra (NARANG; SHARMA, 2011).

A tepoxalina é um exemplo de fármaco administrado na forma bucodispersível em cães que apresentam dores e inflamações crônicas, por exemplo à osteoartrite. Além disso, quando há necessidade de uso prolongado de antibióticos, como infecções do trato urinário, doenças cutâneas crônicas, e também, tratamentos pós-cirúrgicos, é imprescindível a empregabilidade de uma forma farmacêutica cômoda para seu tratamento, podendo ser preparadas na forma de

ODTs. A suplementação canina, mediante incorporação de vitaminas e antioxidantes também pode ser feita com o emprego desta forma de apresentação (YI, 2017). Em estudos realizados por Castro et al. (2013), após a administração de ODTs em cães, foram analisados a exposição plasmática de albendazol quando comparados com comprimidos de forma convencional, resultando em aumento acentuado quando administrado em ODTs.

3.3 POMADAS ORAIS MUCOADESIVAS

Orabases, também conhecidas como pomadas mucoadesivas, podem ser definidas como formas farmacêuticas semissólidas, comumente desenvolvidas para uso tópico na mucosa bucal, contendo fármacos de ação local ou sistêmico, de ação imediata ou lenta, conforme os excipientes presentes na formulação (AHMED; KASRAIAN, 2002; THOMPSON, 2013). São preparadas a partir da mistura de uma base de gel hidrofílico disperso em outra base, de natureza oleosa. A base hidrofílica é geralmente composta por carboximetilcelulose sódica (CMC-Na), gelatina e pectina e, a base anidra, pode conter parafina líquida, sólida ou polietilenoglicóis de massa molar baixa, média e alta (KUTSCHER et al., 1959; THOMPSON, 2013). Outros polímeros naturais ou sintéticos utilizados no preparo da base hidrofílica são a goma adraganta, a polivinilpirrolidona, a hidroxipropilcelulose, a hidroxipropilmetilcelulose, a quitosana e o poli (ácido acrílico) (DERAKHSHANDEHA; ABDOLLAHIPOUR, 2014; PRIPREM et al., 2014).

A capacidade mucoadesiva ou bioadesiva das orabases se fundamenta na capacidade dos polímeros constituintes do gel hidrofílico se ligarem à mucosa e substratos biológicos, elevando seu tempo de permanência no local de aplicação por tempo variável de 15 minutos a 2 horas (MEDRANO, 2005a; MEDRANO, 2005b). Enquanto a permanência de formulações semissólidas convencionais na mucosa bucal é prejudicada pela presença de movimentos mecânicos da língua e da boca, juntamente com o contínuo fluxo salivar na cavidade bucal, nas orabases isto não é observado, pois as mesmas incham em contato com a saliva e permanecem aderidas ao local de aplicação durante certo período, promovendo maior contato e liberação do fármaco (ALLEN, 2002; JIMENEZ-CASTELLANOS; ZIA; RHODES, 1993).

Por apresentarem excelente mucoadesividade, as orabases são de difícil remoção e fácil aplicação, podendo ser utilizadas para profilaxia ou tratamento de doenças da cavidade bucal dos animais, devido à possibilidade da incorporação de fármacos sintéticos ou compostos bioativos com atividade antifúngica, antimicrobiana, anestésica, anti-inflamatória e analgésica, principalmente (SILVA, 2018). Na Figura 3 pode ser vista imagem representativa de uma orabase.

Figura 3 – Imagem ilustrativa de orabase.
Fonte: Salomão et al. (2019).

As pomadas mucoadesivas podem conter flavorizantes em sua composição, sendo capazes de promover melhor aceitação para o tratamento ou profilaxia de doenças periodontais em cavalos e cachorros (INNOCENTI; MOSCATELLI; LOPEZ, 2002). Nos cães, uma patologia recorrente na cavidade oral é a doença periodontal, proveniente de patologias associadas como gengivite, periodontite e cálculos dentários, em consequência do acúmulo de micro-organismos com formação de biofilme e placa (ALBUQUERQUE et al., 2012; DIAS et al. 2008; GORREL, 2005).

A higienização da mucosa bucal apresenta papel relevante na profilaxia da DP e das demais patologias associadas e, estudos relatam o uso de orabases para tal finalidade. Silva (2018) desenvolveram uma formulação de orabase flavorizada contendo três concentrações de extrato hidroalcóolico da casca de romã, e realizaram avaliação *in vitro* da sensibilidade de micro-organismos na amostra coletada da cavidade oral de 12 cães labradores retrievers por swab frente à orabase. Neste teste, as amostras contidas nos swad estéreis foram semeadas em placas de ágar Mueller-Hinton, utilizando a técnica de disco-difusão. Foram feitos 5 poços em cada placa semeada, destes poços, três foram preenchidos com formulações de orabase que apresentavam concentrações diferentes e dois controles (orabase pura e orabase pura sem conservante), juntamente com disco de clorexidina a 0,12%. O resultado do teste foi obtido através da medição dos halos de inibição presente nas placas após serem incubados a 37° C por 12 horas. Verificou-se que a concentração do extrato de romã influencia na atividade antimicrobiana, sendo assim, a orabase contendo extrato hidroalcóolico de romã apresenta redução do biofilme dentário, obtendo resultado promissor para tais patologias. Pereira et al. (2005), produziram dentifrícios contendo extrato da casca de romã e avaliaram a susceptibilidade *in vitro* frente à microrganismos formadores de biofilme, para todas as amostras testadas observou-se a inibição do crescimento microbiano.

3.4 ORGANOGEL E ADESIVOS TRANSDÉRMICOS

Os sistemas transdérmicos são alternativas importantes para a administração de fármacos objetivando ação sistêmica, uma vez que evitam o metabolismo hepático, otimizando a dose e evitando efeitos indesejáveis associados à administração oral. Portanto, a via transdérmica é alternativa à esta última, causando menor irritação e toxicidade sistêmica e protegendo o fármaco da ação do pH ácido do estômago e de enzimas do trato gastrointestinal. Ainda, evita possíveis interações do fármaco com alimentos (MURDAN, 2005). Entre os sistemas transdérmicos de uso veterinário se destacam o organogel e o adesivo (*patch*) transdérmico. Um cuidado a ser tomado no manuseio dos medicamentos transdérmicos pelos tutores é o uso de luvas, uma vez que, conforme o fármaco incluído no sistema, pode haver absorção também pelo tutor (ALEIXO et al., 2004).

A principal desvantagem associada ao uso das formulações transdérmicas é a possibilidade de remoção do produto pelos animais, de grande ou pequeno porte, por ações como exposição do animal à chuva, pelo ato do animal se deitar ou esfregar a região onde o produto foi aplicado, retirando-o, ou por lambedura (FORMENTON et al., 2018). Neste contexto, o gel e os adesivos transdérmicos devem ser aplicados somente em regiões nas quais o animal não alcance. Nos gatos, regiões como lóbulo da orelha, atrás da orelha ou na nuca, são preferíveis. Para os cães, a região lateral do tórax ou dorsal do pescoço, deve ser preferida. Uma desvantagem do seu uso é a possibilidade de irritação local. Dependendo da quantidade de pelo no local de aplicação, este deve ser removido por tricotomia e a pele deve ser limpa com água e sabão (ALEIXO et al., 2004; FORMENTON et al., 2018; SALAZAR; BITENCOURT, 2009).

O gel transdérmico chamado de gel de *Pluronic Lecithin Organogel* (PLO) é composto por uma fase hidrofílica preparada a partir de um copolímero em bloco do polietilenoglicol e, uma fase lipofílica, que contém o palmitato de isopropila e o tensoativo lecitina, um fosfolipídeo natural. Seus derivados sintéticos também podem ser utilizados. Trata-se, portanto, de um sistema emulsionado, nomeado gel orgânico ou organogel, uma vez que se assemelha à constituição da pele - composta por células organizadas em bicamadas lipídicas. Assim, o gel transdérmico possui alta permeabilidade cutânea, facilitando o transporte dos fármacos incorporados a este veículo através da pele (BELGAMWAR et al., 2008; BEZERRA, 2011; LIMA, 2003; MURDAN, 2005).

O gel de PLO pode ser preparado em escala magistral pelo método de extrusão, empregando duas seringas conectadas por um dispositivo (*luerlock*) (FIGURA 4). Na técnica,

em uma seringa é colocada a fase aquosa e na outra a fase oleosa. Ao pressionar vagarosamente os êmbolos, um por vez, a passagem do produto é forçada de um lado ao outro pelo orifício das seringas (extrusão), promovendo mistura e homogeneização do produto (EMBRAFARMA, 2020).

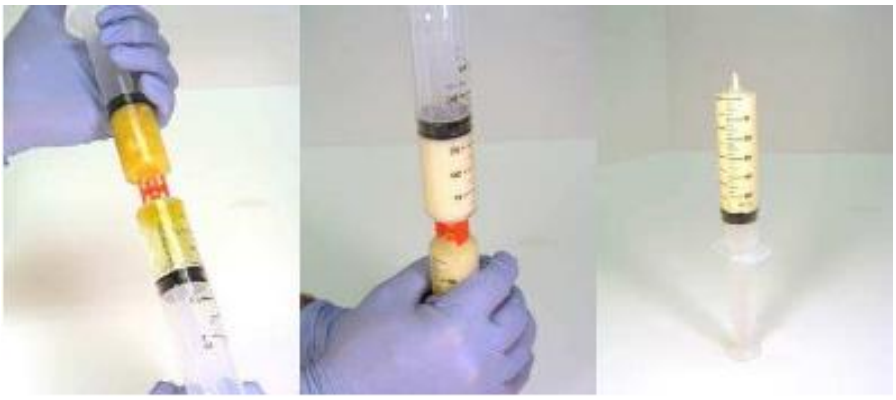

Figura 4 – Representação do processo de preparo do gel de *Pluronic Lecithin Organogel*.
Fonte: Embrafarma (2020).

Durante o transporte de fármaco pelas camadas da pele, o organogel interage com o estrato córneo desorganizando-o temporariamente, sem danificá-lo, permitindo que o fármaco atravesse as camadas até alcançar a circulação sistêmica (BEZERRA, 2011). O gel transdérmico é uma apresentação farmacêutica capaz de permitir a administração de fármacos lipofílicos ou hidrofílicos pela via tópica, não invasiva e de fácil aplicação no animal, diminuindo o desconforto durante a administração, tanto para este como para o tutor. Exemplos de fármacos de interesse para incorporação nos organogéis são hormônios, antieméticos, anti-inflamatórios, analgésicos opióides, entre outros (EMRAFARMA, 2020).

Outra forma farmacêutica alternativa de uso pela via tópica é o adesivo transdérmico. Também chamados de *patches*, os adesivos são formulados para aplicação sobre a pele, com o intuito de promover liberação prolongada do fármaco, possibilitando a administração por período de tempo maior, evitando a administração diária e contribuindo para o conforto dos animais e tutores. Os adesivos transdérmicos possuem ao menos duas camadas, sendo a mais externa a responsável por manter o sistema afixado no local de aplicação e evitando sua perda. A mais interna atua como matriz e reservatório, controlando a liberação do fármaco (TAVARES, 2019). Apesar de não serem preparados em escala magistral, existem patches disponíveis comercialmente para os quais há relatos do uso veterinário, como o adesivo de nitroglicerina e o de fentanil (ALEIXO et al., 2004).

Hoffmann et al. (2003) realizaram um estudo em 13 gatos diagnosticados com hipertireoidismo, tratados com metimazol na forma de organogel aplicado na parte interna da

orelha, com a dose variando entre 2,5 mg a cada 12 horas e 10 mg a cada 10 horas. Todos os gatos apresentaram melhora clínica e não foram observados efeitos colaterais associados a administração transdérmica em nenhum dos gatos.

Murrel et al. (2007) avaliaram, também em gatos, o efeito antinociceptivo de um adesivo transdérmico de buprenorfina, programado para fornecer 35 μg do fármaco por hora. A concentração média de pico de buprenorfina no plasma foi de 10 $ng.mL^{-1}$, obtidos através da medição da concentração plasmática do fármaco provenientes de amostras coletadas em intervalos de tempo previamente estabelecidos. A eficácia antinociceptiva da buprenorfina transdérmica também foi avaliada em cães através de um estudo experimental prospectivo controlado realizado por Pieper et al. (2011), obtendo resultados satisfatórios para o efeito pretendido.

3.5 ESPUMAS

Espuma é uma forma farmacêutica incluída na designação de aerossóis das Farmacopeias Europeia e Americana, nomeada “espuma medicamentosa”. É caracterizada pela presença de um grande volume de gás (fase dispersa ou descontínua), disperso em um líquido ou semissólido (fase dispersante ou contínua) que contém uma ou mais substâncias ativas, e outros excipientes na formulação (FIGURA 5). A espuma é formada pela ação de um propelente, originando bolhas. As espumas convencionais são preparadas a partir de soluções aquosas, suspensões, cremes, loções e géis. Nas espumas sólidas, também chamadas de espumas secas, a fase contínua é um gel (ARZHAVITINA; STECKEL, 2010; NETO, 2014). Na atualidade, diferentes tipos de espumas, preparadas a partir de diferentes bases estão disponíveis. Exemplos são espumas de polietilenoglicol, propilenoglicol e veículo hidroetanólico, entre outras (TAMARKIN; FRIEDMAN; SHEMER, 2016).

As espumas formam colóides termodinamicamente instáveis e são produzidas através da supersaturação do líquido com o gás, ou mecanicamente através da dispersão da fase gasosa no líquido por injeção ou agitação. Para assegurar a formação de espumas com bolhas duradouras, faz-se necessária a incorporação de tensoativos nas formulações, e polímeros, a fim de aumentar a viscosidade da fase líquida. Apesar da natureza delicada, os veículos devem ser firmes o suficiente para que não ocorra coalescência das bolhas, com quebra da estrutura e consequente aumento do tamanho das bolhas. A estabilidade física das preparações se relaciona com mudanças de pressão e temperatura, com o tipo de surfactante utilizado e com a densidade do gás propelente (FARKAS; KÁLLAI-SZABÓ; ANTAL, 2019; NETO, 2014).

Figura 5 – Espuma contendo minociclina para uso tópico no tratamento da acne.
Fonte: Foamix (2020).

As vias de administração mais comuns das espumas são a tópica, retal, vaginal e intra-uterina. As principais vantagens associadas ao uso das espumas são a facilidade de aplicação e remoção e a boa espalhabilidade sobre grande área superficial, não deixando sensação oleosa ou pegajosa, quando comparadas às formulações semissólidas convencionais (TAMARKIN; FRIEDMAN; SHEMER, 2016).

As espumas são usualmente utilizadas na cobertura de feridas e podem conter fármacos com ação antisséptica, anti-inflamatória, cicatrizantes, hormônios e outras (ARZHAVITINA; STECKEL, 2010). Seu uso vem crescendo também no segmento de produtos de higiene e beleza. No entanto, muitos destes produtos não são sistemas aerossolizados, mas produtos envasados em embalagens especiais que, ao expelir uma quantidade do produto – líquido, gel ou loção – leva à formação de bolhas perenes (TAMARKIN; FRIEDMAN; SHEMER, 2016).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A farmacotécnica veterinária é uma área que vem experimentando grande crescimento. Uma vez que é responsável pelo delineamento de produtos veterinários adequados às exigências farmacoterapêuticas dos animais e à conveniência dos tutores. Nem sempre as formas de apresentação convencionais dos medicamentos, comercialmente disponíveis, são as mais adequadas à administração, havendo a necessidade de preparo de formulações alternativas. Neste contexto, a possibilidade de manipular estes produtos em farmácias magistrais auxilia no preenchimento de uma lacuna, no que diz respeito à oferta de produtos mais eficazes e seguros. Portanto, as formas farmacêuticas alternativas preparadas em farmácia magistrais são de grande relevância para a prática da veterinária clínica.

5 REFERÊNCIAS

ABINPET. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. **Dados de Mercado**. 2020. Disponível em: < http://abinpet.org.br/site/mercado/>. Acesso em: 17 jul. 2020.

AHMED, I.; KASRAIAN, K. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 54, n. 6, p. 871-882, 2002.

ALBUQUERQUE, L. et al. Dermóide ocular: revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, Curitiba, v. 10, n. 32, p. 44-47, 2012.

ALEIXO, A. S. et al. Uso do analgésico fentanil transdérmico em um cão. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 7, n. 2-3, p. 140-144, 2004.

ALLEN, L. V. **The art, science and technology of pharmaceutical compounding**. 2. ed. Washington: American Pharmaceutical Associaton, 2002.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ARYA, A. et al. Fast dissolving oral films: an innovative drug delivery system and dosage form. **International Journal of ChemTech Research**, Mumbai, v. 2, n. 1, p. 576-583, 2010.

ARZHAVITINA, A.; STECKEL, H. Foams for pharmaceutical and cosmetic application. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 394, n. 1/2, p. 1-17, 2010.

BARBOSA, C. I. O. G. N. **Novas formas farmacêuticas para uso veterinário**. 2010. 62f. Monografia (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2010.

BELGAMWAR, V. S. et al. Pluronic lecithin organogel. **Asian Journal of Pharmaceutics**, Mandsaur, v. 2, n. 3, p. 134-138, 2008.

BEZERRA, S. S. **Desenvolvimento, avaliação da estabilidade e da atividade anti-inflamatória do gel transdérmico contendo extrato de *Leonotis nepetaefolia***. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia: Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Programa de Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, 2011.

BHARATHI, A. et al. Formulation development and *in vitro* evaluation of orally disintegration tablets of amlodipine besylate. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, Mumbai, v. 2, n. 4, p. 1029-1034, 2012.

BIOMINAS. **Guia de produtos veterinários**. 2017. Disponível em: <http://biominas.org.br/downloads/guia-de-produtos-veterinarios-no-brasil/>. Acesso em: 25 jun. 2020.

BRASIL. **Senado Federal. Projeto de Lei Nº 6590, de 2019**. Estabelece normas e diretrizes relativas à cadeia produtiva de animais de estimação, define o conceito de animais de estimação e dá outras providências. 2019. Disponível em: <https://legis.senado.leg.br/sdleg-getter/documento?dm=8059437&ts=1594038258722&disposition=inline> Acesso em: 28 jul. 2020.

CAPANEMA, L. X. L. Panorama da indústria farmacêutica veterinária. **BNDES**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 157-174, 2007.

CASTRO, S. G. et al. Comparative plasma exposure of albendazole after administration of rapidly disintegrating tablets in dogs. **Bio Med Research International**, London, v. 2013, n. 1, p. 1-7, 2013.

CHUNG, M. et al. Bioavailability of amlodipine besylate following oral administration as a tablet dispersed in applesauce. **Journal of Clinical Pharmacology**, Stamford, v. 45 p. 695-698, 2005.

DERAKHSHANDEHA. K.; ABDOLLAHIPOUR, R. Oral mucoadhesive paste of triamcinolone acetonide and zinc sulfate: preparation and *in vitro* physicochemical characterization. **Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences**, Pequim, v. 3, n. 2, p. 115-125, 2014.

DIAS, L. G. G. G. et al. Doença periodontal em cães. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 6, n. 11, p. 1-6. 2008.

EMBRAFARMA. **Gel transdérmico (Organogel ou PLO). Material instrucional**. 2020. Disponível em: <http://bichosonline.vet.br/wp-content/uploads/2015/04/GEL-TRANSDERMICO.pdf.> Acesso em: 28 jul. 2020.

FARKAS, D.; KÁLLAI-SZABÓ, N.; ANTAL, I. Foams as carrier systems for pharmaceuticals and cosmetics. **Acta Pharmaceutica Hungarica**, Budapest, v. 89, n. 1, p. 5-15, 2019.

FOAMIX. **Foamix enters commercial supply agreement for topical foam antibiotic. Instructional material**. Disponível em: < https://www.outsourcing-pharma.com/Article/2019/10/24/Foamix-enters-topical-foam-antibiotic-supply-agreement?utm_source=copyright&utm_medium=OnSite&utm_campaign=copyright> Acesso em: 23 set. 2020

FORMENTON, M. R. et al. Tratamento com acupuntura e fisioterapia em felino com lesão em nervo radial. **Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, Curitiba, v. 2, n. 48, p. 82-85, 2018.

GORREL, C. **Odontologia em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005.

GOSWAMI, T.; JASTI, B. R.; LI, X. Sublingual drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, Columbia, v. 25, n. 5, p. 449-484, 2008.

HOFFMANN, E. M.; BREITENBACH, A.; BREITKREUTZ, J. Advances in orodispersible films for drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, London, v. 8, n. 3, p. 299-316, 2011.

HOFFMANN, G. et al. Transdermal methimazole treatment in cats with hyperthyroidism. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 5, n. 2, p. 77-82, 2003.

INNOCENTI, G. M.; MOSCATELLI, G.; LOPEZ, S. Efficacy of gel clair in reducing pain in palliative care patients with oral lesions: preliminary findings from an open pilot study. **Journal of Pain and Symptom Management**, Madinson, v. 24, n. 5, p. 456-457, 2002.

JIMENEZ-CASTELLANOS, M. R.; ZIA, H.; RHODES, C. T. Mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 19, p. 143-194, 1993.

JULIANI, C. S. R. **Medicamentos: noções básicas, tipos e formas farmacêuticas**. São Paulo: Érica, 2014.

KUMAR, G. P. et al. Polyvinylpyrrolidone oral films of enrofloxacin: film characterization and drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 471, n. 1-2, p. 146-152, 2014.

KUTSCHER, A. H. et al. A new vehicle (orabase) for the application of drugs to the oral mucousmembranes. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, St. Louis, v. 12, n. 9, p. 1080-1089, 1959.

LACERDA, C. M. **Tabletes orodispersíveis contendo besilato de anlodipino para uso pediátrico**. 2020. 52 f. Monografia apresentada para obtenção do título de Bacharel em Farmácia (Graduação em Farmácia). Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2020.

LEE, Y. et al. Orally disintegrating films focusing on formulation, manufacturing process, and characterization. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, Korea, v. 47, p. 183-201, 2017.

LIMA, A. P. **Obtenção, caracterização e avaliação microbiológica de uma nova forma farmacêutica contendo hidroquinona**. 2003. 111 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Farmacêutica) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

LIMA, M. A. et al. Farmácia veterinária: a importância do profissional farmacêutico. **Revista Saúde em Foco**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 1303-1320, 2019.

MEDRANO, J. P. Formas farmacêuticas in veterinária (I). **Farmacia Profesional**, Lisboa, v. 9, n. 2, p. 74-77, 2005a.

MEDRANO, J. P. Formas farmacéuticas in veterinária (II). **Farmacia Profesional**, Lisboa, v. 9, n. 4, p. 80-84, 2005b.

MURDAN, S. Organogels in drug delivery. **Expert Opinion in Drug Delivery**, London, v. 2, n. 3, p. 1-17, 2005.

MURREL, J. C. et al. Use of a transdermal matrix patch of buprenorphine in cats: preliminary pharmacokinetic and pharmacodynamic data. **Veterinary Record**, London, v. 160, p. 578-583, 2007.

NARANG, N.; SHARMA, J. Sublingual mucosa as a route for systemic drug delivery. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 18-22, 2011.

NETO, A. F. **Utilização intracoágulo de espuma fibrinolítica**: Preparação, caracterização e atividade *in vitro* de uma espuma de estreptoquinase e proposta de uma nova abordagem terapêutica. 2014. 95 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

NICOLETTI, M. A.; FUKUSHIMA, A. R. Seguimento farmacoterapêutico direcionado aos animais domésticos: seria viável. **Infarma**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 246-250, 2014.

PACHALY, J. R. et al. Doses alométricas de cetamina e xilazina para contenção farmacológica e anestesia dissociativa de aves passeriformes. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 30, p. 24-28, 2010.

PAYNE-JOHNSON, M.; MAITLAND, T. N.; GOSSELLIN. J. An evaluation of the relative palatability of two commercial oral tablet formulations of carprofen and meloxicam in dogs using acceptance and preference tests. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 158, p. 519-524, 2007.

PAYNE-JOHNSON, M. et al. Comparative palatability of three commercial formulations of carprofen and one commercial formulation of firocoxib in dogs. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 157, p. 431-440, 2006.

PEREIRA, J. V. et al. Estudos com o extrato da *Punica granatum* Linn. (romã): efeito antimicrobiano *in vitro* e avaliação clínica de um dentifrício sobre microrganismos do biofilme dental. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 20, n. 49, p. 111-222, 2005.

PETRY, G.; FOURIE, J.; WOLKEN, S. Comparison of the palatability of a new flavoured drontal plus tablet (Drontal® Plus Treat 10 kg) and Milbemax® chewable tablets when presented to privately owned dogs. **Open Journal of Vereninary Medicine**, Chade, v. 4, p. 163-169, 2014.

PIEPER, K. et al. Antinociceptive efficacy and plasma concentrations of transdermal buprenorphine in dogs. **The Veterinary Journal**, Amsterdam, v. 187, n. 3, p. 335-341, 2011.

PRIPREM, A. et al. Effect of polymeric combinations on mucoadhesive and swelling properties of orabase gel formulations. **Advanced Materials Research**, London, v. 853, p. 3-8, 2014.

SALAZAR, F. R.; BITENCOURT, M. S. Produtos veterinários dermatológicos veterinários. **Infarma**, São Paulo, v. 21, n. 5/6, p. 6-9, 2009.

SALOMÃO, S. B. et al. Desenvolvimento farmacotécnico de orabases. In: XIX ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XIX ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO E IX ENCONTRO DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA 2019, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: Universidade do Vale da Paraíba, 2019, p. 1-5.

SARTURI, L. **Manipulação de medicamentos veterinários como área de atuação do farmacêutico**. 2017. 35 f. Monografia apresentada para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia (Graduação em Farmácia), Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Ariquemes, Roraima, 2017.

SCARPA, M. et al. Orodispersible films: towards drug delivery in special populations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 523, n. 1, p. 327-335, 2017.

SHARMA, V.; MCNEILL, J. H. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 157, n. 6, p. 907-921, 2009.

SILVA, T. M. **Orabase contendo extrato de romã para uso como adjuvante na higienização da cavidade oral de cães**: desenvolvimento farmacotécnico e avaliação antimicrobiana preliminar *in vitro*. 2018. 45 f. Monografia apresentada para obtenção do título de Bacharel em Farmácia (Graduação em Farmácia), Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, 2018.

TAMARKIN, D.; FRIEDMAN, D.; SHEMER, A. Emollient foam in topical drug delivery. **Expert Opinion in Drug Delivery**, London, v. 3, n. 6, p. 799-807, 2016.

TAVARES, M. A. P. N. **Desenvolvimento farmacêutico de sistemas transdérmicos: estratégias e oportunidades.** 2019. 64 f. Monografia para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de Coimbra, Coimbra, 2019.

THOMPSON, J. E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TIWARI, S.; MITKARE, S.; BHANGALE, P. Veterinary dosage forms: review. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, Mumbai, v. 6, n. 1, p. 20-29, 2014.

TRASS, A. M. et al. Ease of oral administration and owner-perceived acceptability of triglyceride oil, dissolving thin film strip, and gelatin capsule formulations to healthy cats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 71, p. 610–614, 2010.

VILLANOVA, J. C. O.; GUEDES, R. A.; SEVERI, J. A. Desafios farmacêuticos no desenvolvimento de produtos veterinários. In: DEMINICIS, B. B.; MARTINS, C. B. (Org.). **Tópicos especiais em Ciência Animal III**. Alegre: CAUFES, 2014, p. 231-241.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VISSER, J. C. Quality by design approach for optimizing the formulation and physical properties of extemporaneously prepared orodispersible films. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 485, p. 70-76, 2015.

YI, T. The application prospects and development trends of orally disintegrating tablets to dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 04, e20160614, 2017.

Produtos farmacêuticos para uso como adjuvantes na higienização bucal de cães

Daiana Freitas Ferreira[1]
Thaís Martins da Silva[2]
Sanderson Vieira Batista[3]
Elder de Oliveira Caetano[4]
Eliseu Polastreli Pirovani[5]
Janaína Cecília Oliveira Villanova[6]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: daiafreitasferreira@hotmail.com.br
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: martins.tms@outlook.com
[3] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: sanderson14@ucl.br
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: elder.oliveirac@icloud.com
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: eliseupolaspir@gmail.com
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: pharmacotecnica@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Os animais de companhia desempenham importante papel na melhoria da qualidade de vida das pessoas, podendo aumentar estados de felicidade e diminuir sentimentos de solidão, levando a melhora das funções físicas e emocionais (COSTA, 2006). Entre os animais de estimação, a maior população é a dos cães (ABINPET, 2019). Uma pesquisa realizada por Voith, Wright e Danneman (1992) revelou que na década de 90, aproximadamente 98% dos tutores sentiam que o cão era membro ou quase-membro das famílias.

Apesar do aumento crescente desta população, nem sempre os tutores cuidam integralmente da saúde bucal dos cães, cabendo ao médico veterinário orientá-los acerca da importância dos cuidados gerais com alimentação saudável e higiene bucal, com vistas a proporcionar melhor qualidade e expectativa de vida para seus companheiros (VENTURINI, 2006). A odontologia veterinária se caracteriza como uma área de especialização do médico veterinário e vem despertando grande interesse e desenvolvimento nos últimos anos. É crescente o número de profissionais que vêm buscando cursos de especialização na área, fazendo com que essa especialidade ganhe espaço no mercado (DUBOC, 2009; GOMES, 2019).

Existem diversas patologias que acometem a cavidade oral de cães, tais como neoplasias, gengivite, periodontite, lesões por fratura, formação de placa e doença periodontal (DP), sendo esta última, a mais comum (HARVEY, 2005; TELHADO et al., 2004). Além de intervenções farmacológicas nos casos mais graves da DP, a profilaxia se caracteriza como importante ferramenta para reduzir sua incidência, mantendo os dentes dos animais saudáveis por toda a vida (LYON, 1991). A prática mais eficaz é a escovação diária, visto que a ação mecânica produzida pelo atrito destrói o biofilme dentário (DUPONT, 1998; GORREL, 2004). No entanto, o proprietário pode encontrar dificuldades para executar a limpeza diária ou no tempo recomendado pelo médico veterinário, em função do temperamento do animal (HALE, 2003). Adjuvantes capazes de remover o biofilme, por métodos mecânicos ou químicos, podem auxiliar na remoção do biofilme e placa, contribuindo para a profilaxia da DP. Existem no mercado, algumas alternativas como biscoitos, brinquedos e produtos farmacêuticos capazes de auxiliar tal função (GIOSO, 2007; SANTOS, 2007). Neste cenário, o objetivo do presente capítulo é apresentar um resumo dos produtos farmacêuticos capazes de agir como adjuvantes na remoção do biofilme e da placa dentária, evitando o desenvolvimento da DP em cães.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO DA ODONTOLOGIA VETERINÁRIA E SUA IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE BUCAL DOS ANIMAIS DE COMPANHIA

Há relatos de que o início da odontologia veterinária tenha surgido por volta dos anos 600 a.C. na China, devido à grande importância que era dada para os cavalos como animais para uso no transporte, militar, esportivo e em função do seu potencial mecânico (HARVEY, 1994). Com base em pesquisas, avanços tecnológicos e, influenciada pela multidisciplinaridade entre as diversas profissões da saúde, a odontologia animal segue se sedimentando na prática veterinária, já sendo considerada uma ciência que estuda a saúde bucal, suas patologias relacionadas, profilaxias e tratamentos das mesmas (CARIBÉ, 2016; EASLEY, 1999). Uma vez que a anatomia animal é muito diferente da humana, a prática da odontologia veterinária é atividade privativa do médico veterinário, cujo conteúdo é abordado nas matrizes curriculares de inúmeros cursos superiores, bem como, em cursos de capacitação ou especialização ofertados por inúmeras instituições (CIFFONI; PACHALY, 2001).

A relação milenar estabelecida entre cães, gatos e os homens, quando positiva, pode desencadear benefícios psicológicos, fisiológicos e sociais mútuos. Ao longo dos tempos, os animais deixaram de ser apenas rebanhos e passaram a conviver intimamente com os humanos, sendo designados animais de estimação ou companhia (pets). Os pets passaram a ser considerados parte da família sendo intitulados, inclusive, como filhos (MACENTE et al., 2016). Nas três últimas décadas, o número de animais de companhia vem experimentando grande aumento. No ano de 2013, o instituto brasileiro de geografia e estatística (IBGE, 2013), estimou a proporção de domicílios com cachorros ou gatos, sendo contabilizados 44,3% de casas com animais de estimação (SILVA, 2008). Dados atualizados da associação brasileira da indústria para animais de estimação (ABINPET), a população animal do Brasil era de aproximadamente, 141,6 milhões de animais, dos quais 55,1 milhões eram cães e 24,7 milhões, gatos, sendo o restante dividido entre peixes ornamentais, aves canoras e ornamentais e pequenos mamíferos e répteis. O crescimento acumulado nas populações de cães e gatos, entre 2018 e 2019, foi de 1,7% e 3%, respectivamente (ABINPET, 2019).

Com o aumento da população de pets e, com a finalidade de diminuir os danos causados pelas enfermidades bucais e propor cuidados gerais para promoção da saúde e embelezamento destes animais, a prática da odontologia veterinária preventiva tem se desenvolvido grandemente (COSTA, 2020). No entanto, a saúde bucal dos cães nem sempre é colocada como prioridade por seus tutores, sendo necessárias intervenções dos profissionais nos alertas dos cuidados mínimos com a higiene do aparelho bucal (DUBOC, 2009; VENTURINI, 2006).

O conceito de higienização e prevenção de doenças orais é bem estabelecido na cultura humana, porém, o mesmo não acontece com a higiene bucal dos animais de companhia, especialmente, para os cães. O comprometimento da saúde oral destes animais pode desencadear desde problemas leves, tais como, mal odor, dor e desconforto, até problemas mais graves, capazes de interferir na ingestão de água e alimentos e favorecer o surgimento de complicações sistêmicas que podem levar ao óbito (VENTURINI, 2006). As ações profiláticas constantes se consolidam, então, como essenciais para a prevenção de tais comprometimentos e redução do avanço das patologias bucais (DUBOC, 2009; GORREL, 2004; SANTOS; CARLOS; ALBUQUERQUE, 2012).

3 CAVIDADE BUCAL DOS CÃES

A boca é a porta de entrada do sistema digestivo e, qualquer disfunção nesta região pode causar desde desconfortos mais simples até casos de doenças mais severas, capazes de provocar redução da ingestão alimentar, condições sistêmicas associadas ou mesmo o óbito do animal (VENTURINI, 2006).

A boca é composta pela cavidade oral ou bucal, propriamente dita e o vestíbulo, na qual estão inseridos lábios, paredes, dentes, língua e glândulas salivares. Ela tem início entre os lábios e se estende até o início da faringe e, suas principais funções estão relacionadas com a alimentação; ao ataque e defesa em situações de perigo ou lutas; controle da perda de calor, através de ofegos; e, com a respiração em situações nas quais o nariz está prejudicado (DYCE; SACK; WENSING, 2010; EVANS; LAHUNTA, 2001). A visão geral da boca e seus componentes estão apresentados na Figura 1A.

A cavidade bucal propriamente dita se refere ao espaço presente entre as arcadas dentárias, sendo delimitada pelo palato na parte dorsal, pelos dentes e gengivas nas laterais, e pela língua na parte ventral. O maxilar é o maior osso da face do cão, sendo responsável por sustentar os dentes superiores e formar o teto da cavidade oral (palato). Já a mandíbula sustenta os dentes inferiores e forma as paredes e assoalho da cavidade oral, que é sustentada pelo osso hióide. Seu tamanho pode variar de acordo com a abertura da boca, podendo ser maior quando a boca está aberta ou menor quando fechada, variando ainda pela posição da língua dentro da cavidade. O vestíbulo corresponde ao espaço entre as arcadas dentárias e os lábios do cão (CABRAL; ENDO; JUNIOR, 2017; DYCE; SACK; WENSING, 2010; EVANS; LAHUNTA, 2001).

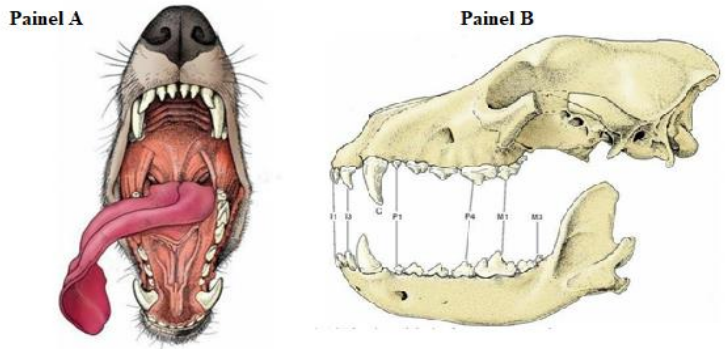

Figura 1 – Visão geral da boca (Painel A) e visão lateral da dentição dos cães (Painel B).
Fonte: Dyce, Sack e Wensing (2010).

A dentição dos cães é simples e adaptada aos seus comportamentos alimentares (Figura 1B). Os dentes são muito utilizados durante a alimentação, para que o animal consiga separar e mastigar partes do alimento, facilitando sua ingestão e digestão, mas também, são utilizados para a caça, para o alívio de coceiras, deslocamento dos filhotes, apreensão de outros objetos e em lutas contra outros animais (DYCE; SACK; WENSING, 2010; KOWALESKY, 2005).

Os dentes caninos são alongados e cônicos e bem desenvolvidos. Os cães possuem 42 dentes permanentes, sendo: 12 incisivos, com 6 dentes distribuídos em cada lado da arcada dentária; 4 caninos, com 2 na arcada superior e 2 na inferior; 16 dentes pré-molares, possuindo 8 em cada arcada. Diferentemente dos outros dentes, os molares não estão distribuídos igualmente em cada arcada dentária; a superior possui 4 dentes, enquanto a inferior possui 6 (DYCE; SACK; WENSING, 2010; KOWALESKY, 2005). Cada dente, é formado por três camadas - polpa, esmalte e dentina e, é dividido em três regiões, que são a raiz, o colo e a coroa. A raiz é a região que se encontra dentro da gengiva e é recoberta pelo cemento. Já a coroa, é a região visível do dente e é recoberta pelo esmalte. Por fim, o colo é a região que está presente entre a raiz e a coroa (MORAIS, 2020).

Outra região importante do dente é o periodonto, composto pela gengiva, ligamento periodontal (tecido conjuntivo fibroso), cemento e osso alveolar, cuja função é fornecer sustentação e proteção aos dentes. A gengiva é uma estrutura responsável por dar proteção aos dentes e recobre a raiz e o osso alveolar. O cemento é formado por tecido conjuntivo calcificado e reveste a raiz do dente, sendo depositado de maneira contínua durante a vida do animal. O osso alveolar possui cavidades conhecidas como alvéolos, que são os locais onde os dentes estão inseridos graças à fixação fornecida pelo ligamento periodontal (MORAIS, 2020).

Os cães possuem ainda na cavidade bucal diversas glândulas salivares, entre elas a glândula parótida, a glândula mandibular, a glândula sublingual e a glândula zigomática. A produção de saliva por essas glândulas ocorre normalmente de maneira contínua, porém a

velocidade de produção pode variar de acordo com alguns fatores, como a ansiedade e o medo, que podem diminuir a produção de saliva, e a desidratação, que pode interromper totalmente. Já a introdução de substâncias na boca aumenta a produção, principalmente quando se trata de alimentos. As principais funções da saliva estão relacionadas com a limpeza mecânica da boca e dos dentes e auxiliar na digestão dos alimentos (DYCE; SACK; WENSING, 2010). O pH da cavidade bucal dos cães é alcalino, variando entre 7,3 a 9,0 (GIOSO, 2007).

4 PATOLOGIAS DE MAIOR PREVALÊNCIA NA CAVIDADE BUCAL DOS CÃES

O bem-estar e a sanidade integral dos cães estão diretamente ligados à saúde bucal. Muitas vezes, a presença de dor, incômodo e sangramento gengival pode alterar o comportamento dos pets e, embora ocorram alterações comportamentais, a patologia somente será percebida durante uma consulta (GORREL, 2004). Por diversas vezes são diagnosticadas nas cavidades orais dos cães, mais de uma patologia ao mesmo tempo, o que torna tanto o diagnóstico quanto o tratamento, desafiadores, uma vez que os sintomas de muitas são semelhantes. As afecções mais observadas são neoplasias, estomatite crônica, reabsorção radicular, cálculos, placas dentárias, gengivite, periodontite e a doença periodontal propriamente dita (GORREL, 1998; GORREL, 2004).

Entre as patologias citadas, a doença periodontal (DP) merece destaque. A DP se inicia com a ocorrência de gengivite e periodontite, ambas desencadeadas pela formação de biofilme e deposição de placas. O biofilme e as placas, por sua vez, são oriundos do acúmulo de micro-organismos na superfície dos dentes, podendo progredir até os tecidos de sustentação que formam o periodonto, provocando diversos graus de inflamação e de infecção dos tecidos bucais, causando dor e halitose - principal sintoma clínico da doença. Formação de edema e sangramento, também podem estar associadas, com eventual fratura da mandíbula e/ou perda do dente. O surgimento de efeitos sistêmicos, com comprometimento cardíaco, hepático e urinário também pode ocorrer (BARNETT, 2006; GARCIA et al., 2008; SANTOS; CARLOS; ALBUQUERQUE, 2012). Um estudo realizado por Ramos (2010) onde cães com doença periodontal, induzindo um trauma oral mediante procedimentos odontológicos, os resultados dos 22 hematológicos e hemoculturas revelaram um efeito sistêmico da doença sugerindo a ocorrência de bacteremia.

Apesar de possuir etiologia multifatorial, uma resposta imuno-inflamatória induzida pela presença de biofilme dentário e deposição de placas, na região cervical dos dentes, parece ser a principal causa da DP. Os biofilmes dentários podem ser definidos como comunidades

dinâmicas de células microbianas firmemente aderidas a uma superfície biótica e abiótica e, embebidas em uma matriz extracelular. São compostos, predominantemente, por micro-organismos endógenos envoltos por proteínas e glicoproteínas presentes na saliva e no fluido gengival (ROUDEBUSH; LOGAN; HALE, 2005). A composição do biofilme é dinâmica, pois, incorpora outros componentes oriundos da alimentação e do hábito de roer. A progressão da formação do biofilme dentário induz diversas alterações no equilíbrio microbiano, podendo originar a placa dentária, formada por agregados de bactérias e seus subprodutos, componentes salivares, detritos orais e células epiteliais e inflamatórias ocasionais (RIGGIO et al., 2011). Telhado et al. (2004) verificaram que a severidade da doença periodontal é acompanhada pela gravidade da presença de cálculos e precipitação do cálcio no biofilme dentário, facilitada pelo pH alcalino da saliva dos cães. Foram identificadas inúmeras bactérias na microbiota oral de cães sadios e portadores de DP, sendo de maior prevalência as espécies: *Bacteroides heparinolyticus*, *Pasteurella dagmatis*, *Actinomyces canis*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus Porphyromonas gingivalis*, *Desulfomicrobium orale*, *Porphyromonas salivosa*, *Porphyromonas denticanis*, *Porphyromonas gulae*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*, entre outras (GIOSO, 2007; GORREL, 2004; HARDHAM et al., 2005).

Uma vez que a evolução na formação de biofilme e deposição das placas são eventos que favorecem a DP, procedimentos físicos e/ou químicos para a remoção de ambos são essenciais na etapa de profilaxia. Em estudo realizados por Roza e Santana (2018), mais de 80% dos animais adultos acompanhados apresentam DP. Tal fato pode estar relacionado à desinformação dos tutores a respeito da manutenção da saúde bucal de seus animais de companhia, evidenciando, a importância das ações profiláticas e higienização para o combate da mesma (FERNANDES et al., 2012; MADEIRA, 2017).

5 HIGIENIZAÇÃO BUCAL DOS CÃES

A formação do biofilme ocorre quase imediatamente após a realização de procedimento profissional de limpeza dos dentes. Estudos demonstraram que em poucos minutos após o polimento, aproximadamente um milhão de micro-organismos são depositados por mm^2 de superfície de esmalte (ROUDEBUSH; LOGAN; HALE, 2005). Além de consultas rotineiras aos consultórios para realização de cuidados especializados como polimento, a profilaxia realizada pelo proprietário do animal no ambiente doméstico, como prática de *home care*, se constitui como procedimentos efetivos para o controle da DP. A remoção física do biofilme e

da placa bacteriana, associada ao uso de agentes de limpezas, são as armas mais eficazes na prevenção da DP (ROUDEBUSH; LOGAN; HALE, 2005). O controle da deposição contínua de ambos, através de procedimentos de escovação com o uso de dentifrício contendo antissépticos, rotineiramente, pode prevenir a ocorrência de inflamação e infecção características da DP (GIOSO, 2007). Pelo exposto, podemos dividir os métodos de higienização bucal dos cães em dois tipos: baseados nos métodos físicos e nos métodos químicos.

5.1 MÉTODOS FÍSICOS DE HIGIENIZAÇÃO BUCAL

O método primário de higienização a ser adotado pelos tutores é o físico, baseado na escovação dos dentes dos pets. A escovação deve, idealmente, ser realizada diariamente, como forma de inibir a formação do biofilme e adesão de placa dentária, a partir do atrito promovido com a superfície do dente (ROUDEBUSH; LOGAN; HALE, 2005). No entanto, em função do comportamento do animal, nem sempre é possível realizar a escovação diária. Recomenda-se, então, além do polimento e escovação regulares em consultório, uma frequência de escovação superior a 4 vezes por semana para que o resultado no controle da deposição do biofilme e formação da placa seja satisfatório (PIRES et al., 2013). Tal prática é capaz de impedir o progresso da formação da DP, podendo alcançar 95% de eficácia, se feita adequadamente (GORREL, 1998; PIRES et al., 2013). A escovação pode ser realizada com uma dedeira ou escova comum, promovendo atrito entre a escova e os dentes, o que interrompe e/ou destrói o biofilme (MADEIRA, 2017). A maneira como é feita a escovação dos dentes dos animais deve ser observada, para não causar nenhum tipo de lesão nas gengivas. Devem ser realizados movimentos circulares, no sentido da gengiva para a coroa, fazendo com que as cerdas da escova “varram” as sujeiras. Além disso, deve-se escolher escovas dentais com as cerdas macias e que se adequem ao tamanho e à estrutura individual da boca do animal (DUPONT, 1998; GORREL, 2004). Ainda, o uso de fio dental, quando possível, deve ser considerado (RYLANDER; LINDHE; ROSLING, 1992).

Uma forma alternativa que pode ser adotada como conduta veterinária é a oferta de dispositivos que promovem fricção com a superfície dos dentes, em função da capacidade de remoção do acúmulo de substratos que propiciam a formação do biofilme e da placa. A eliminação de sujidades maiores por raspagem pode minimizar a proliferação e a instalação dos micro-organismos. Tais dispositivos são entendidos pelos animais como brinquedos (JEUSETTE, 2016; RAY; EUBANKS, 2009). No mercado existem brinquedos com formatos

variados, tais como biscoitos, tiras e ossos, disponíveis em diferentes sabores, cheiros e texturas, auxiliando na higienização bucal e prevenção da DP, visto que os animais de distraem com os dispositivos por longos períodos diários (CASE; CAREY; HIRAKAWA, 1998; GALLAGHER, 2013).

Outra forma de higienização física é a oferta de alimentos com diferentes formatos, tamanhos e texturas, que também causam atrito com os dentes (LAGE et al., 1990; WATSON, 1994). Lepine (2004) observou que, alterar a textura e tamanho dos grânulos de alimentos oferecidos aos animais foi capaz de evitar o aparecimento de cálculo dentinário, uma vez que os alimentos promoveram a raspagem mecânica do dente. Oferecer uma dieta rica em alimentos mais moles e mais aderentes aos dentes, quando comparados àqueles mais duros e consistentes, pode favorecer a instalação de problemas dentários (HARVEY; SHOFER; LASTER, 1993). Os petiscos mastigáveis (*dental chews*) são uma excelente alternativa para auxiliar na higienização bucal dos cães, uma vez que têm boa aceitação pelos animais (PRIPREM et al., 2014).

Todavia, dados da literatura indicam que o uso de adjuvantes físicos baseados na mastigação de brinquedos e alimentos que favorecem o atrito, não provoca remoção das sujidades e da carga microbiana em todos os dentes de maneira uniforme. Além disso, a ação abrasiva só acontece de modo efetivo enquanto o animal está mastigando o produto, sem efeito continuado. A eficácia do método também pode ser diminuída em cães que não praticam adequadamente a mastigação. Neste cenário, a escovação e o polimento em consultórios, bem como a escovação em casa, não devem ser substituídos por esta prática (COX; LEPINE; CAREY, 2003; PAIVA et al., 2007).

5.2 MÉTODOS QUÍMICOS DE HIGIENIZAÇÃO BUCAL

Os métodos de higienização bucal baseados na remoção física do biofilme e da placa nem sempre são suficientes quando aplicados sozinhos, devendo ser associado a estes, métodos químicos, tais como o uso de agentes de limpeza, antissépticos sintéticos e naturais, enzimas, minerais e outros. No que diz respeito aos agentes de limpeza, os tensoativos se destinam a remover os restos de alimentos e as gorduras residuais da cavidade bucal, reduzindo a carga microbiana e evitando a fixação do biofilme (CORRÊA; VENTURINI, 1996; GORREL, 2004). Todavia, dado o avanço das afecções observadas, faz-se necessária a associação também de ingredientes farmacologicamente ativos tais como: agentes antissépticos, capazes de atuar inibindo a proliferação microbiana, reduzindo-a; enzimas, capazes de destruir as interações

químicas formadas entre o biofilme bacteriano e a superfície dos dentes, removendo-as; minerais, que atuam inibindo a formação de cálculos dentinários, entre outros. Os principais tipos de ingredientes ativos incorporadas nos produtos de higiene bucal de uso veterinário disponíveis comercialmente são enzimas, minerais e antissépticos sintéticos e naturais (CLARKE, 2001; GALLAGHER, 2013).

Entre as formas farmacêuticas usualmente encontradas para uso na higienização bucal dos cães, as principais são as soluções, os cremes, as pastas, os géis e as espumas para escovação e, as pomadas mucoadesivas (CLARKE, 2006; ROUDEBUSH; LOGAN; HALE, 2005). Os produtos semissólidos podem ser aplicados diretamente nas escovas ou com dedeiras e, os líquidos, podem ser embebidos em algodão, cotonetes ou aplicados por irrigação, com o uso de seringas e frascos com atomização (*spray*), diretamente na cavidade bucal. Além da incorporação em formas farmacêuticas específicas, os ingredientes ativos podem ser adicionados em gomas e petiscos mastigáveis, bem como nos brinquedos dos cães (BROWN; MCGENTITY, 2005).

A clorexidina, na forma digluconato (GC), é o antisséptico sintético de uso mais comum para a higienização bucal dos cães, estando disponível na forma de solução (0,12 % a 0,5 % p/v). Apesar do GC ser o composto de escolha para controle da placa dentária, o uso da substância a longo prazo apresenta uma série de efeitos desagradáveis como a perda do paladar, pigmentação do esmalte, ardência e ulceração da mucosa bucal, o que torna sua aplicação periódica não recomendada (PIERI et al., 2012).

Sais solúveis de zinco têm sido utilizados em vários produtos de cuidados domiciliares para os animais, principalmente, por serem eficazes no controle do mau odor oral originados da presença de compostos voláteis de enxofre. O zinco, administrado na forma de ascorbato ou gluconato, se liga ao enxofre formando compostos insolúveis, de pouco ou nenhum odor (TONZETICH, 1977). Ainda, aos diferentes sais solúveis de zinco é atribuída ação antimicrobiana (CLARKE, 2001).

Polifosfatos minerais têm a finalidade de impedir a mineralização da placa dentária, diminuindo ou impedindo a formação do cálculo. Estes minerais podem permanecer depositados na placa, sendo liberados aos poucos e apresentando ação de longo prazo (LEPINE, 2004). Tiras de couro para mastigação, revestidas com hexametafosfato de sódio (HMFS), foram utilizadas em estudos e os autores observaram que o uso das mesmas reduziu a formação do cálculo dentinário e o aparecimento de novas manchas nos dentes dos animais (PAIVA, 2004). O HMFS também pode ser incorporado em petiscos mastigáveis e, após mastigação e solubilização na saliva do animal, alcançam a superfície dos dentes, evitando o cálculo.

Pesquisas realizadas com cães demonstraram que o uso de tripolifosfato e hexametafosfato de sódio acrescido a rações secas pode reduzir a formação de cálculo entre 50 a 80 % (STOOKEY et al., 1996).

Segundo estudos, o uso das enzimas glicoseoxidase e lactoperoxidase pode promover redução da carga microbiana na cavidade bucal. Estas enzimas se combinam com oxigênio e água na saliva, formando hipotiocianita, íon ao qual é atribuída atividade antimicrobiana. O sistema enzimático lactoperoxidase salivar endógena está presente naturalmente na saliva dos cães. A outras enzimas, como a papaína, é atribuída ação debridante, que rompem a formação de ligações químicas que levam à deposição das placas sobre a superfície dos dentes (CORRÊA; VENTURINI, 1996; GORREL, 2004; HARO; ABAD, 2015).

Na atualidade, tem sido dada grande atenção para o uso de compostos bioativos naturais, em substituição aos ingredientes ativos sintéticos para a preparação de produtos de higiene de uso animal. Abdalla et al. (2015) investigaram o efeito da administração oral tópica de extrato aquoso de folhas de *Kalanchoe gastonis-bonnieri* (KGB) sobre o desenvolvimento do biofilme dental em cães da raça Beagle e observaram que o tratamento foi eficaz no controle da doença periodontal em cães. Extratos de diferentes partes da romãzeira, obtidos com diferentes solventes, têm despertado o interesse dos profissionais da odontologia por demonstrarem, em estudos *in vitro* e *in vivo*, que são capazes de reduzir sinais de inflamação gengival e periodontal, prevenindo a instalação da placa dentária, em função de suas propriedades antimicrobiana e antioxidante, o que justifica sua incorporação em enxaguantes bucais, pastas dentais e outros produtos destinados à higiene bucal dos cães (BHADBHADE et al., 2011; KIANY; HOSSEIN; MOAHAMMAD, 2016; KOTE; NAGESH, 2011).

Kesavalu, Bakthavatchalu e Rahman (2007) realizara um estudo no qual avaliaram a ação do ômega-3 sobre os tecidos da gengiva de ratos e verificaram que o composto atuou reduzindo a inflamação na gengiva de animais infectados com *P. gengivalis* e, promoveram redução na reabsorção do osso alveolar. Há relatos em estudos que os polifenóis são os metabólitos responsáveis pela ação antibacteriana, eliminando os patógenos bucais e controlando patologias da região bucal dos animais. Alguns exemplos são: polifenóis do vinho sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*; polifenóis da cranberry, inibindo cepas de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*; e, polifenóis do chá verde, sobre a quantidade de bactérias Gram-negativas anaeróbicas *Porphyromonas gingivalis e Prevotella spp* (HIRASAWA et al., 2002; HO, 2001).

5.3 ADJUVANTES DE USO NOS ALIMENTOS E BEBIDAS

Estudos relatam que a adição de determinados ingredientes aditivos em alimentos e bebidas dos animais, com vistas à obtenção de ação sistêmica, podem ser úteis nas afecções bucais dos cães, inclusive, na profilaxia da DP. Entre estes se destacam o xilitol, a vitamina C, extratos de plantas medicinais; hidróxido de cloro; algas desidratadas; hexametafosfato de sódio; brinquedos, ossinhos de couro ou fibra vegetal (BAIA et al., 2017; ROZA; SANTANA, 2018).

A vitamina C mostrou relação, por exemplo, com a cicatrização de lesões na cavidade bucal, atuando a prevenção na DP: observou-se que, em animais que faziam a ingestão de menor quantidade de vitamina C, ocorria um aumento de problemas relacionados aos tecidos da cavidade oral (NISHIDA et al., 2000). Lindinger (2016) observou em um estudo exploratório multicêntrico que a ingestão de água contendo um composto denominado OCP, formado por enzimas vegetais com ação antimicrobiana, chá verde, dextrose, bicarbonato de sódio e ácido ascórbico, promoveu atenuação da formação de placas dentárias quando consumido juntamente com a água, mesmo na ausência de outras medidas de higiene bucal. O autor observou que utilização de OCP na água reduziu cerca de 37 % a formação da placa, levou à ausência de gengivite, com manutenção de um hálito fresco nos cães estudados. Outros estudos indicam que a ingestão de chá verde, que possui ação antioxidante, pode auxiliar na prevenção de DP, halitose e cárie (HAMILTON-MILLER, 2001; HIRASAWA et al., 2002; KAUR; JAIN; KAUAR, 2014; SAKANAKA et al., 1996).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A odontologia veterinária é uma especialidade que vem sendo cada vez mais buscada tanto por tutores preocupados com a qualidade de vida dos seus animais de companhia, quanto dos médicos veterinários, que vêm buscando atender a esta demanda. Uma vez que as afecções da cavidade bucal dos cães podem apresentar consequências desde as mais amenas, como mal odor e desconforto, até as mais graves, com complicações sistêmicas, métodos de prevenção devem ser adotados precocemente. Assim, a busca por tratamento especializado, nos consultórios, bem como medidas de *home care*, devem ser priorizadas pelos tutores. Neste contexto, aliar métodos físicos e químicos de higiene da cavidade bucal, com frequência, são medidas que devem ser incentivadas pelos médicos veterinários e, acatadas pelos tutores. E

escovação dos dentes e uso de produtos veterinários contendo antissépticos podem contribuir para o bem-estar dos pets e evitar problemas futuros.

7 REFERÊNCIAS

ABDALLA, S. L. et al. Efficacy of a *Kalanchoe gastonis-bonnieri* extract to control bacterial biofilms and dental calculus in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 37, n. 8, p. 859-865, 2017.

ABINPET. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. **Dados de Mercado**. 2019. Disponível em: < http://abinpet.org.br/site/mercado/>. Acesso em: 17 jul. 2020.

BAIA, J. D. et al. Doença periodontal em cães: revisão de literatura. **Scientific Electronic Archives**, Rondonópolis, v. 10, n. 5, p. 150-162, 2017.

BARNETT, M. L. The oral-systemic disease connection: An update for the practicing dentist. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 137, n. 2, 5S-6S, 2006.

BHADBHADE, S. J. et al. The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse. **Quintessence International**, Berlin, v. 42, n. 1, p. 29, 2011.

BROWN, W. Y.; MCGENTITY, P. Effective periodontal disease control using dental hygiene chews. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 22, n. 1, p. 16-19, 2005.

CABRAL, A. P. M.; ENDO, V. T.; JÚNIOR, O. C. M. P. Estudo anatomo radiográfico da cavidade oral canina - revisão de literatura. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, Maringá, v. 4, p. 143-148, 2017.

CARIBÉ, C. L. **Odontologia e medicina veterinária**: um diálogo necessário para ampliar as possibilidades de atuação. 2016. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Departamento de Odontologia, Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2016.

CASE, L. P.; CAREY, D. P.; HIRAKAWA, D. A. **Nutrição canina e felina**. 2. ed. Lisboa: Harcourt Brace, 1998.

CIFFONI, E. M. G.; PACHALY, J. R. Considerações históricas e legais sobre a odontologia veterinária no Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 4, n. 1, p. 49-54, 2001.

CLARKE, D. E. Clinical and microbiological effects of oral zinc ascorbate gel in cats. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 18, n. 4, p. 177-183, 2001.

CLARKE, D. E. Drinking water additive decreases plaque and calculus accumulation in cats. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 23, p. 79-82, 2006.

CORRÊA, H. L; VENTURINI, M. A. F. A. Cálculo dentário subgengival. **Clínica Veterinária de Pequenõs Animais**, Madri, v. 1, n. 5, p. 6-7, 1996.

COSTA, E. C. **Animais de estimação**: uma abordagem psico-sociológica da concepção dos idosos. 2006. 195 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

COSTA, H. X. **A importância do médico veterinário no contexto de saúde pública.** Documento em hipertexto. 2020. Disponível em: <https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/Seminario2011_Herika_Costa_1.pdf> Acesso em: 10 jun. 2020.

COX, E. R.; LEPINE, A. J.; CAREY, D. P. Influencias nutricionales en la salud dental del perro. **Revista de Medicina Veterinária de Buenos Aires**, Buenos Aires, v. 83, n. 6, p. 265-272, 2003.

DUBOC, M. V. **Percepção de proprietários de cães e gatos sobre a higiene oral de seu animal**. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

DUPONT, G. A. Prevention of periodontal disease. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Oxford, v. 28, n. 5, p. 1129-1145, 1998.

DYCE, K. M.; SACK, W. O; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

EASLEY, K. Veterinary dentistry: its origin and recent history. **Journal of the History of Dentistry**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 83-85, 1999.

EVANS, H. E.; LAHUNTA, A. **Guia para dissecação do cão**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FERNANDES, N. A. et al. Prevalência de doença periodontal em cães e nível de consciência dos proprietários - um estudo clínico prospectivo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 4, p. 446-451, 2012.

GALLAGHER, L. The effect of dental products and natural chews on canine oral bacteria. **Letters in General Microbiology**, Ontario, v. 1, n. 16, p. 1-4, 2013.

GARCIA, C. Z. et al. Doença periodontal em cães. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garças, v. 6, n. 11, p. 1-6, 2008.

GIOSO, M. A. **Odontologia para o clínico de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2007.

GOMES, A. F. **Avaliação *in vitro* da efetividade de compostos antissépticos bucais no controle da placa bacteriana de cães e gatos**. 2019. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

GORREL, C. Periodontal disease and diet in domestic pets. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, n. 12, p. 2712S-2714S, 1998.

GORREL, C. **Veterinary dentistry for the general practitioner**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2004.

HALE, F. A. The owner-animal-environment triad in the treatment of canine periodontal disease. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 20, n. 2, p. 118-122, 2003.

HAMILTON-MILLER, J. M. T. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 50, n. 4, p. 299-302, 2001.

HARDHAM, J. et al. Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 1-2, p. 119-128, 2005.

HARO, C.; ABAD, M. **Manual práctico de nutrición clínica en el perro y el gato**. Barcelona: Multimédica Ediciones Veterinarias, 2015.

HARVEY, C. E. Management of periodontal disease: understand the options. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Florida, v. 35, n. 4, p. 819-836, 2005.

HARVEY, C. E.; SHOFER, F. S.; LASTER, L. Correlation of diet, other chewing activities and periodontal disease in North America client-owned dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 13, n. 3, p. 101-105, 1993.

HARVEY, C. E. The history of veterinary dentistry part one: from the earliest record to the end of the 18th century. **Journal of Veternary Dentistry**, Boise, v. 11, n. 4, p. 135-139, 1994.

HIRASAWA, M. et al. Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 37, n. 6, p. 433–438, 2002.

HO, K. Y. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 53, p. 187–191, 2001.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013:** acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de janeiro, 2013. Disponível em: <biblioteca.ibge.gov.br >. Acesso em: 20 jul. 2020.

JEUSETTE, I. C. 24-hour evaluation of dental plaque bacteria and halitosis after consumption of a single placebo or dental treat by dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 77, n. 6, p. 613-619, 2016.

KAUR, H.; JAIN, S.; KAUAR, A. Comparative evaluation of the antiplaque effectiveness of green tea catechin mouthwash with chlorhexidine gluconate. **Journal of Indian Society of Periodontology**, Mumbai, v. 18, n. 2, p. 178-182, 2014.

KESAVALU, L.; BAKTHAVATCHALU, V.; RAHMAN, M. M. Omega-3 fatty acid regulates inflammatory cytokine/mediator messenger RNA expression in *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontal disease. **Oral Microbiology and Imunology**, Bethesda, v. 22, p. 232-239, 2007.

KIANY, F.; HOSSEIN, N.; MOHAMMAD, N. Assessing the effect of pomegranate fruit seed extract mouthwash on dental plaque and gingival inflammation. **Journal of Dental Research and Review**, Mumbai, v. 3, n. 4, p. 117-123, 2016.

KOTE, S.; NAGESH, L. Effect of pomegranate juice on dental plaque microorganisms (*Streptococci* and *Lactobacilli*). **Ancient Science of Life**, Philadelphia, v. 31, n. 2, p. 49–51, 2011.

KOWALESKY, L. **Anatomia dental de cães (*Cannis Familiaris*) e gatos (*Felis Catus*). Considerações Cirúrgicas**. 2005. 183 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

LAGE, A. et al. Effect of chewing raehide and cereal biscuit on removal of dental calculus in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 197, n. 2, p. 213-219, 1990.

LEPINE, A. J. Influências Nutricionais sobre a Saúde Dentária. In: PAIVA, A. C. **Coadjuvantes de higiene bucal na alimentação de cães**. 2004. Disponível em: <http:// https://www.sapili.org/subir-depois/dplivros/cp005396.pdf >. Acesso em: 20 jul. 2019.

LINDINGER, M. I. Reduced dental plaque formation in dogs drinking a solution containing natural antimicrobial herbal enzymes and organic matcha green tea. **Scientifica**, London, v. 3, p. 1-8, 2016.

LYON, K. F. Dental home care. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 8, n. 2, p. 26-30, 1991.

MACENTE, B. I. et al. Evolução do programa de controle reprodutivo de cães e gatos realizado na Unesp, Campus de Jaboticabal-SP, no período de 2007 a 2014. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 6-11, 2016.

MADEIRA, B. A. M. **Patologias orais: será que os tutores portugueses sabem o estado da saúde oral dos seus animais**. 2017. 43 f. Dissertação. (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra, Portugal, 2017.

MORAIS, F. C. C**. Saúde oral de cães e gatos, como se comportam os tutores? Uma análise da relação entre os tutores e as práticas de higienização bucal**. 2020. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2020.

NISHIDA, M. et al. Calcium and the risk for periodontal disease. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 71, n. 7, p. 1057-1066, 2000.

PAIVA, A. C. **Coadjuvantes de higiene bucal na alimentação de cães e gatos**. 2004. 83 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Monogástricos) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

PAIVA, A. C. et al. Eficácia dos coadjuvantes de higiene bucal utilizados na alimentação de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p. 1177-1183, 2007.

PIERI, F. A. et al. Periodontal disease in dogs. In: PEREZ-MARIN, C. C. **A bird's-eye view of veterinary medicine**. Rjeka: IntechOpen. 2012, p. 132.

PIRES, B. C. et al. Doença periodontal: fisiopatogenia e tratamento (relato de caso e revisão)**. Nosso Clínico**, São Paulo, v. 96, p. 6-10, 2013.

PRIPREM, A. et al. Effect of polymeric combinations on mucoadhesive and swelling properties of orabase gel formulations. **Advanced Materials Research**, Warrendale, v. 853, p. 3-8, 2014.

RAMOS, A. S. **Bacteremia transitória e risco de endocardite em cães com doença periodontal em diferentes procedimentos odontológicos e usuais.** 2010. 81f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

RAY, J. D.; EUBANKS, D. L. Dental home care: teaching your clients to are for their pet's teeth. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 26, n. 1, p. 57–60, 2009.

RIGGIO, M. P. et al. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 150, n. 3-4, p. 394-400, 2011.

ROZA, M. R.; SANTANA, S. B. **Odontologia veterinária: princípios e técnicas**. São Paulo: Medvet, 2018.

ROUDEBUSH, P.; LOGAN, E.; HALE, F. A. Evidence-based veterinary dentistry: a systematic review of homecare for prevention of periodontal disease in dogs and cats. **Journal of Veterinary Dentistry**, Boise, v. 22, n. 1, p. 6-15, 2005.

RYLANDER, H.; LINDHE, J.; ROSLING, B. **Tratado de periodontologia clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

SAKANAKA, S. et al. Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 60, n. 5, p. 745-749, 1996.

SANTOS, I. C. **Doença periodontal em cães**. 2007. 50 f. Dissertação (Especialização em Clínica Médica de Pequenos Animais) - Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2007.

SANTOS, N. S.; CARLOS, R. S. A.; ALBUQUERQUE, G. R. Doença periodontal em cães e gatos-revisão de literatura. **MEDVEP. Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação**, São Paulo, v. 10, p. 30-41, 2012.

SILVA, M. A. R. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Punica granatum* Linn. em linhagens de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 209-212, 2008.

STOOKEY, G. K. et al. Hexametaphosphate-coated snacks biscuits significantly reduces calculus formation in dogs. **Journal Veterinary Dentistry**, Boise, v. 13, n. 1, p. 27-30, 1996.

TELHADO, J. et al. Incidência de cálculo dentário e doença periodontal em cães da raça pastor alemão. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 5, n. 2, p. 99-104, 2004.

TONZETICH, J. Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 48, n. 1, p. 13-20, 1977.

VENTURINI, M. A. F. A. **Estudo retrospectivo de 3055 animais atendidos no ODONTOVET® (centro odontológico veterinário) durante 44 meses**. 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

VOITH, V. L.; WRIGHT, J. C.; DANNEMAN, P. J. Is there a relationship between canine behavior problems and spoiling activities, anthropomorphism, and obedience training. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 263-272, 1992.

WATSON, A. D. J. Diet and periodontal disease in dogs and cats. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 71, n. 10, p. 313-318, 1994.

Complexos de inclusão: o uso das ciclodextrinas na medicina veterinária

Priscila de Oliveira Lorenzoni[1]
Délia Chaves Moreira dos Santos[2]
Sergio Antonio Fernandes[3]
Adilson Vidal Costa[4]
Vagner Tebaldi de Queiroz[5]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: priscilalorenzoni@gmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: deliachavesmoreira@gmail.com
[3] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: sefernandes@gmail.com
[4] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: avcosta@hotmail.com
[5] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: vagnertq@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CDs) são alvo de pesquisas científicas em diversas áreas desde 1891 até os dias atuais, de superior importância no setor farmacológico, seguido do setor da indústria de alimentos. O motivo pelo grande interesse nessas moléculas se dá pela capacidade de tornar outras moléculas mais estáveis e solúveis através de interações não covalentes (MURA, 2020; VENTURINI et al., 2008).

No setor farmacológico, a inclusão de CDs em formulações resulta em melhoras terapêuticas, considerada uma metodologia consolidada. Estudos compilaram que 515 princípios ativos já foram associados às CDs em pesquisas científicas. Alguns medicamentos são comercializados contendo CDs em sua composição (SZEJTLI, 2005). Como exemplo de princípios largamente utilizados, o protetor gástrico Omeprazol – β-CD (Omebeta®) e o anti-inflamatório Piroxicam – β-CD (Brexin®), que obtiveram diminuição das reações adversas após a inclusão da β-ciclodextrina (β-CD) na formulação (LOFTSSON; BREWSTER, 2010).

As CDs possuem estrutura capaz de encapsular outras moléculas, resultando em mudanças que podem aumentar ou diminuir propriedades das moléculas encapsuladas, ou seja, além de melhorar consideravelmente a biodisponibilidade, estabilidade e solubilidade dos fármacos complexados, é possível mascarar odores e sabores, fixar substâncias muito voláteis, estabilizar substâncias sensíveis à luz, calor, oxidação e diminuir a irritação à mucosas (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

A terapêutica veterinária se beneficia das propriedades das CDs, ainda que pesquisas em formulações de medicamentos e nutracêuticos sejam em maioria focadas na saúde humana. Não obstante, grande parte dos medicamentos utilizados em tratamentos veterinários são de apresentações para uso humano, porém há estudos que inserem estes medicamentos na medicina veterinária (PLUMB, 2018). Além disto, a indústria farmacêutica veterinária é um setor em ascensão. O aumento da receita líquida de vendas de medicamentos veterinários no Brasil entre os anos de 1996-2014 foi de 613,4 % (RODRIGUES; COSTA; KISS, 2018).

Neste capítulo serão descritas as características das CDs e de seus complexos de inclusão, sua aplicabilidade e estudos direcionados especificamente à medicina veterinária. As CDs são relatadas associadas à terapêutica de diversas espécies de animais, incluindo medicações antifúngicas, antibióticas, antiparasitárias, anestésicas, formulações para uso oftálmico, além do seu uso na nutrição animal e também é amplamente utilizada como agente de melhora na criopreservação de sêmen equino, bovino, suíno, entre outras espécies.

2 CICLODEXTRINAS – HISTÓRICO, ESTRUTURA E PROPRIEDADES

As ciclodextrinas (CDs) foram descobertas por Villiers em 1891. Nos anos seguintes, foram relatadas a caracterização estrutural, isolamento, fracionamento e produção dessas moléculas. Em 1953 foi redigida a patente, a qual tratava da principal propriedade das CDs: a formação de complexos de inclusão. Na patente foram descritos aspectos como o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, proteção de substâncias que poderiam ser facilmente oxidadas e a redução da volatilidade de algumas substâncias (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007). Na década de 70, muitos complexos de inclusão foram estudados, e, devido ao baixo custo, houve grande progresso no desenvolvimento de métodos de preparo e aplicações dos complexos de inclusão (VENTURINI et al., 2008).

Estruturalmente as CDs são oligossacarídeos cíclicos, compostos por seis ou mais unidades de *D*-glicopiranose unidas entre si por ligações do tipo α (1-4). As estruturas das CDs, estão dispostas na forma de cone truncado apresentando os grupos hidroxílicos secundários, que se encontram localizados na extremidade mais larga, estando ligados aos átomos de carbono C2 e C3, ao passo que os grupos hidroxílicos primários se encontram na extremidade mais estreita e ligado aos carbonos C6 (BEKERS et al., 1991).

A presença de grupos hidroxilas nas extremidades favorece a solubilidade das CDs em água, apresentando característica hidrofílica em seu exterior, enquanto seu interior apresenta caráter hidrofóbico (FIGURA 1) (CRINI et al. 2018).

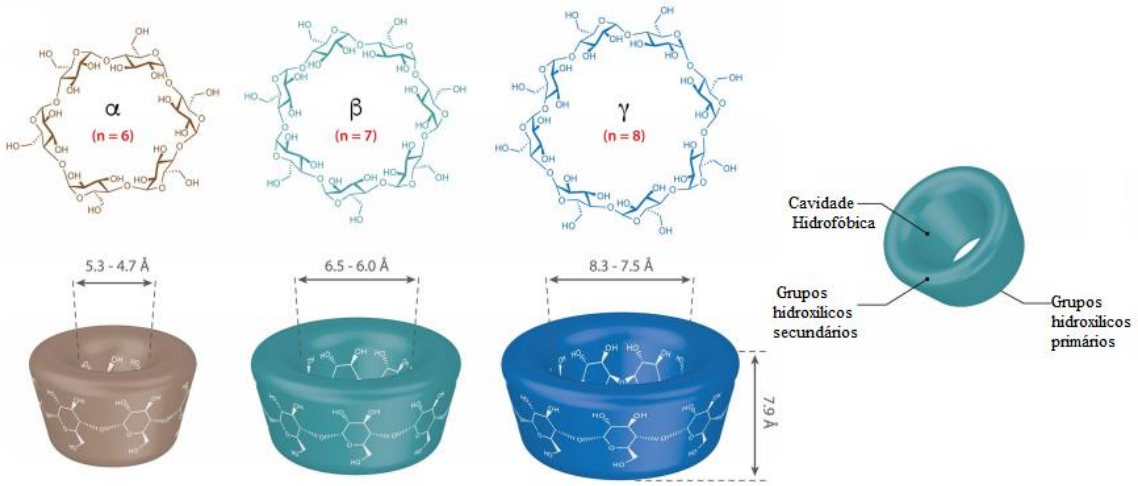

Figura 1 – Dimensões das ciclodextrinas naturais α-CD, β-CD e γ-CD.
Fonte: Adaptado de Crini et al. (2018).

Este fenômeno é explicado através da sua estrutura química, o interior da cavidade é delineado pelos átomos de hidrogênio e pelas ligações alfa 1-4 glicosídicas (BEKERS et al., 1991; JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018). Os pares de elétrons não-ligantes do

oxigênio estão voltados para o interior da cavidade, proporcionando alta densidade eletrônica, o que resulta em ambiente com comportamento de uma base de Lewis e caráter hidrofóbico. Já a disposição dos hidrogênios bem como dos grupos hidroxilas, voltados para o exterior das CDs, torna a superfície externa hidrofílica (LI; PURDY, 1992).

2.1 CICLODEXTRINAS NATURAIS

Existem três tipos de CDs naturais, as α-ciclodextrinas (α-CD), β-ciclodextrinas (β-CD) e γ-ciclodextrinas (γ-CD), compostas de 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente (FIGURA 1), o que confere propriedades físico-químicas inerentes a cada CDs (VENTURINI et al., 2008).

Enquanto na β-CD todas as ligações de hidrogênio intramoleculares possíveis ocorrem, a rigidez do interior da cavidade reduz a solubilidade quando comparada a γ-CD. Na α-CD quatro das seis possíveis ligações de hidrogênio intramoleculares podem ocorrer devido a uma unidade de glicose estar em posição torcida. A γ-CD possui uma estrutura não-coplanar, o que a torna a mais flexível e, consequentemente, mais solúvel entre as três ciclodextrinas (CRINI et al., 2018).

2.2 CICLODEXTRINAS MODIFICADAS

As CDs modificadas foram planejadas com intuito de melhorar a solubilidade das CDs naturais e reduzir a toxicidade. São derivados semissintéticos produzidos pela substituição dos grupos hidroxila das CDs naturais por outros grupos funcionais como metil, hidroxipropil, acetil, etil, entre outros (CRINI et al., 2018).

Dentre estes derivados, a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD), originada do tratamento da β-CD com óxido de propileno, se destaca pela sua solubilidade em água de 600mg/mL. É considerada segura para administração enteral e parenteral, além de estar presente nos compêndios oficiais da Farmacopeia Americana e Europeia. Também é citada na lista de excipientes farmacêuticos considerados inativos pelo FDA (VENTURINI et al., 2008).

2.3 COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Os complexos de inclusão, como o nome diz, refere-se à capacidade das CDs de incluírem outras moléculas em suas cavidades hidrofóbicas. Essa relação é denominada hóspede-hospedeiro (FIGURA 2). Nesse caso, as moléculas de CDs são consideradas moléculas hospedeiras ou receptoras, enquanto as moléculas inclusas são as hóspedes ou substratos (CRINI et al., 2018).

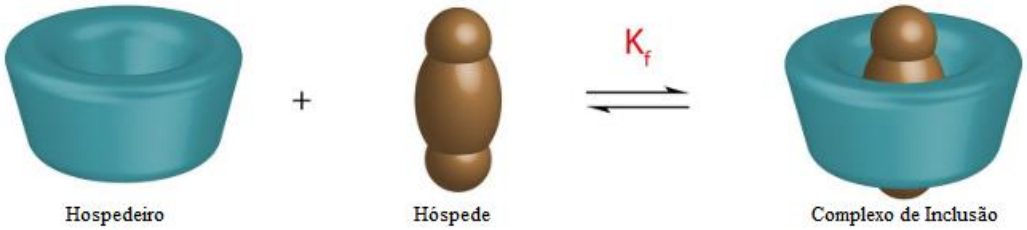

Figura 2 – Representação esquemática da relação hóspede-hospedeiro em complexos de inclusão.
Fonte: Adaptado de Crini et al. (2018).

Para que ocorra a inclusão da molécula hóspede, ou seja, a formação do complexo de inclusão, esta molécula deve ter compatibilidade estrutural e físico-química, com a cavidade hidrofóbica da CDs hospedeira. Como exemplo, as α-CD possuem cavidade pequena (5,7 Å) e são utilizadas na complexação de moléculas pequenas ou de cadeias laterais de moléculas grandes, como as prostaglandinas, enquanto as β-CD (7,8 Å) são úteis na complexação de moléculas que possuam pelo menos um anel aromático, enquanto as γ-CD (9,5 Å) para complexar moléculas grandes, como antibióticos macrolídeos e esteroides (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018). Outro fator decisivo na formação do complexo é a polaridade da molécula hóspede, moléculas hidrofóbicas possuem maior afinidade pela cavidade apolar das CDs (LOFTSSON; BREWSTER, 2010).

2.3.1 Métodos de preparação dos complexos de inclusão

Diversas técnicas são utilizadas na obtenção dos complexos de inclusão. Sua escolha depende não apenas do complexo final obtido, mas também da simplicidade do método, baixo custo, rendimento elevado, rapidez e, principalmente, facilidade de transposição de escala (JACOB; NAIR, 2018; MURA et al., 1999; SZEJTLI, 2004). De maneira geral os métodos de preparação dos complexos de inclusão são:

Kneading/Malaxagem ou pasta: resulta da mistura de quantidades equimolares da CD e do fármaco utilizando solventes (geralmente etanol e água). A mistura é realizada em almofariz com pistilo ou misturador de alto cisalhamento. Uma pasta uniforme é então obtida e o solvente é evaporado em dessecador com vácuo até a obtenção do complexo em pó (JACOB; NAIR, 2018; VILLAVERDE et al., 2004).

Co-evaporação: consiste na solubilização da CD e do fármaco em uma mistura de água e solvente miscível na água. A solução resultante é submetida ao rota-evaporador para que o solvente seja retirado, obtendo-se o complexo em pó com melhoria da interação quando comparada à técnica anterior (JACOB; NAIR, 2018).

Co-precipitação: a CD e o fármaco são solubilizados em água e em solvente adequado, respectivamente. Em seguida, as soluções obtidas são homogeneizadas sob temperatura e agitação constantes. A mistura obtida é resfriada até a obtenção de um precipitado, o qual é filtrado e lavado com solvente para a remoção do fármaco que não foi complexado. Utilizado normalmente em escala laboratorial, uma vez que se utiliza grande quantidade de água anterior (VENTURINI et al., 2008).

Spray-drying/Atomização: a CD e o fármaco são solubilizados em água e em solvente miscível em água, respectivamente. Em seguida, as soluções obtidas são homogeneizadas por sonicação até obtenção de uma solução límpida, sendo o solvente removido utilizando secagem por pulverização. Técnica não indicada para compostos voláteis e termicamente lábeis (CHEW; TAN; NYAM, 2018).

Freeze-drying/Liofilização: a CD é completamente solubilizada em água e, posteriormente, o fármaco é adicionado à solução de CD. A mistura permanece sob agitação constante durante período de tempo pré-determinado, sendo congelada em seguida e submetida à liofilização. O processo de liofilização é tido como um dos mais eficientes um vez que pode garantir proteção contra a decomposição química, minimizar perda de atividade devido às temperaturas de processamento baixas e levar a redução do teor de umidade a níveis muito baixos. Tem como vantagem ser utilizado tanto em escala laboratorial quanto em escala industrial (WANG; CHEN; REN, 2017).

Mistura física: obtida pela junção da ciclodextrina (CD) e do fármaco a ser complexado. Pode haver interação entre eles, mas a mistura física é utilizada geralmente como padrão de não complexação (MURA et al., 1999).

2.3.2 Caracterização dos complexos de inclusão

As propriedades físico-químicas do fármaco e das CDs livres são diferentes das que possuem os complexos de inclusão. A modificação nos sinais das CDs é consequência direta das alterações geradas pela relação hóspede-hospedeiro. Desta perspectiva, qualquer metodologia capaz de medir estas diferenças pode ser utilizada para caracterizar a ocorrência da formação destes complexos (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007). A seguir, são apresentados de maneira resumida alguns métodos empregados na caracterização dos complexos de inclusão na forma dinâmica (em solução) ou forma estática (sólida).

Em solução, a formação do complexo de inclusão pode ser detectada através de análise dicroísmo circular, espectrofotometria de UV- Vis e de fluorescência. Para os estudos que envolvem complexos em fase sólida são utilizadas com mais frequência as técnicas de difração de raios-X, análise termogravimétrica (TG), calorimetria de varredura diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e estudos de dissolução. Outras metodologias mais recentes são: a espectroscopia de Raman, eletroforese capilar, potenciometria, calorimetria de titulação isotérmica (ITC) (VENTURINI et al., 2008).

Estas técnicas auxiliam no estudo da estrutura, constante de estabilidade e estequiometria dos complexos formados. Porém, a análise por ressonância magnética nuclear (RMN) é o método mais seguro para comprovar a estrutura do complexo formado a partir da observação minuciosa das alterações dos sinais obtidos tanto para as CDs como para os substratos complexados (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

Com estas informações é possível prever a topologia do complexo para melhorar a interação do fármaco com a cavidade das CDs e realizar um planejamento racional para formulações.

3 COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINAS NA MEDICINA VETERINÁRIA

3.1 TERAPÊUTICA VETERINÁRIA

A seleção dos trabalhos apresentados neste tópico baseou-se apenas em pesquisas direcionadas ao tratamento de animais, embora sejam descritos na literatura diversos medicamentos para uso humano de eficácia comprovada quando complexados às ciclodextrinas (CDs). Muitos destes medicamentos são comercializados e podem ser utilizados em medicina

veterinária (JACOB; NAIR, 2018). Alguns medicamentos importados de uso veterinário contendo CDs estão listados na Tabela 1. Entretanto, não é possível inferir se existem medicamentos veterinários comercializados atualmente com CDs em sua formulação no Brasil. Devido ao segredo de empresa utilizado pela maioria das instituições no país, os excipientes utilizados em medicamentos veterinários não são divulgados.

O albendazol é um anti-helmíntico muito utilizado na rotina sanitária de rebanhos. A administração oral do complexo de inclusão entre albendazol e 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) em ovinos aumentou em 37% a biodisponibilidade do medicamento quando comparado a administração do medicamento convencional (EVRARD et al., 2002). Ao serem avaliadas as coproculturas de cordeiros antes e após a administração do complexo albendazol com HP-β-CD foi verificada a redução de larvas. Esta redução foi 15 % maior quando comparado ao medicamento convencional (PACHECO et al., 2018).

Tabela 1- Medicamentos de uso veterinário com ciclodextrinas em sua formulação

Nome comercial	Ciclodextrina	Descrição do medicamento
Itrafungol™	HP-β-CD	Princípio ativo: Itraconazol Antifúngico.
Dexolve™	Sulfobutil-eter-β-ciclodextrina (SE-β-CD)	Princípio ativo: Voriconazol Antifúngico.
Nexterone ™	SE-β-CD	Princípio ativo: Amiodarona Antiarrítmico.
Vetmedin™	Ciclodextrina modificada eterificada*	Príncipio ativo: Pimobendan Vasodilatador, tratamento de cardiopatia em cães.
Cerenia™	SE-β-CD	Princípio ativo: Maropitant Tratamento de náusea e vômito em cães e gatos.
Alfaxan™	HP-β-CD	Alfaxalona: Anestésico.
Suvaxyn PCV ™	Sulfolipo-ciclodextrina (SL-CD)	Imunização de suínos à Circovírus.
Cevac Uni L®	HP-β-CD	Imunização de frangos à Newcastle.

*A patente não especifica a ciclodextrina (LEHNER, 2007)
Fonte: Sohadja [2020].

O praziquantel, outro antiparasitário rotineiramente utilizado em terapias veterinárias, mostrou aumento de 5 vezes na solubilidade quando associado a β-CD, o que indica aumento do potencial terapêutico *in vivo* (JESUS et al., 2006).

O toltrazuril é um fármaco utilizado no tratamento de coccidioses em muitas espécies, a sua associação com HP-β-CD mostrou aumento da solubilidade de mais de 24.000 vezes, de $4{,}12 \times 10^{-4}$ para 9,90 mg/mL, após a formação do Tol-HP-β-CD, e maior biodisponibilidade na administração oral em coelhos (ZHANG et al., 2018).

A β-CD foi avaliada no tratamento de infecção natural por *Cryptosporidium parvum* em bezerros. A administração da CD na dose de 500 mg/kg de peso corporal por 3 dias consecutivos diminuiu a gravidade da diarreia e diminuiu a duração do derramamento de oocistos (CASTRO-HERMIDA et al., 2001).

Os efeitos curativos da injeção intramuscular de complexos de inclusão de griseofulvina e ivermectina com β-CD, bem como o complexo de inclusão de cetoconazol e ivermectina com β-CD no tratamento de coinfecção de dermatófitos e acarídeos em coelhos foi considerado eficaz. A eliminação dos sintomas ocorreu em 4 dias, com eficácia superior dos tratamentos convencionais por via oral. Os animais não apresentaram reações adversas (LI et al., 2006).

O uso da furazolidona no tratamento da leishmaniose foi descrito, no entanto, o medicamento causa reações adversas como anorexia, perda de peso, perda de coordenação motora e fadiga em cães. O experimento realizado por membros do Programa de pós graduação em ciências veterinárias (PPGCV-UFES), mostrou que o complexo de inclusão de furazolidona e β-CD reduz a toxidade celular e possui atividade leishmanicida sobre *Leishmania amazonensis* (CARVALHO et al., 2018).

A adição de SL-CD como adjuvante na vacina contra herpesvírus bovino tipo 1, revelou melhora na resposta imunitária, redução da eliminação viral na secreção dos animais tratados e ausência de reação vacinal no local de aplicação, esta pesquisa é considerada de grande contribuição para a indústria de vacinas veterinárias (ROMERA et al., 2000).

O florfenicol é um antibiótico de amplo espectro, mas apresenta efeito indesejável como inflamação no local da injeção do medicamento devido à sua baixa solubilidade. Com base neste fato, a complexação do florfenicol com HP-β-CD aumentou em 35,4 vezes a solubilidade do florfenicol comercial. Além disso, o teste *in vivo* em cães da raça beagle, o complexo florfenicol-HP-β-CD aumentou a meia-vida de eliminação, a concentração máxima após injeção e diminuiu o tempo de pico de concentração do medicamento, além de não causar reação inflamatória no local de aplicação (FAN et al., 2019).

O antibiótico enrofloxacina, apresenta amplo espectro de ação e pode ser utilizado em bovinos, suínos, aves, cães e gatos, entretanto possui baixa solubilidade em água. A formação do complexo da enrofloxacina com HP-β-CD foi comprovada e sua solubilidade aumentada em 32,5 %. Este aumento pode levar à melhora de seu potencial terapêutico (ZADRA et al., 2009).

O voriconazol em gel contendo CDs em sua formulação foi descrito para o tratamento de ceratites micóticas em equinos. A formulação contendo CDs aplicado na conjuntiva não apresentou reações adversas, e teve boa difusão na córnea e esclera dos equinos tratados. O sucesso do tratamento está ligado a maior solubilidade do princípio ativo gerada pelas CDs (CUMING et al., 2017).

Estudos com o anestésico alfaxalona associado às CDs iniciaram em 1990, motivados pela sensibilidade alérgica de algumas espécies a esta formulação. O que limitava a aplicação do anestésico na veterinária e também levou à retirada do produto do mercado para uso humano na época. A resposta anestésica ao alfaxalona com HP-β-CD em cães não foi acompanhada de liberação maciça de histamina e diminuição acentuada na respiração e pressão sanguínea observadas após o uso da formulação comercial da época (ESTES et al., 1990). Atualmente, é possível encontrar formulação comercial contendo alfalaxona-HP-β-CD, mostrando-se segura para indução de anestesia em cães e gatos, com alterações cardiorrespiratórias não significativas e de recuperação pós-anestésica suave (CHIU et al., 2016; PASLOSKE et al., 2018). Em ovinos, a alfaxalona em HP-β-CD administrada em bolus intravenosa a 2 mg/kg gerou efeitos adversos mínimos e recuperação anéstesica sem intercorrências (ANDALUZ et al., 2012). Em pôneis o anéstesico na forma de complexo com CDs forneceu características de indução e recuperação adequadas para manutenção de anestesia para castração à campo (LEECE; GIRARD; MADDERN, 2009).

O minoxidil é utilizado em cães com perda de pelo por doenças genéticas, hormonais e atopias, foi demonstrado que o complexo de inclusão do fármaco com HP-β-CD torna a formulação mais estável e favorece o crescimento de pelos de melhor qualidade do que emprego do medicamento sem as CDs (TRICARICO et al., 2018).

A atropina é amplamente utilizada na medicina veterinária, seja como antiespasmódico nas contrações intestinais, dilatador dos brônquios no colapso respiratório ou como antídoto a medicamentos e organofosforados (PLUMB, 2018). A adição de β-CD à formulação de atropina mostrou que essa nova formulação garantia liberação de atropina em mesma quantidade, mesmo quando ocorresse variações de pH. O mesmo não é verdadeiro para a formulação convencional que possui variação de liberação do fármaco em função do pH (HE et al., 2020).

O uso de CDs associadas a produtos naturais também está em ascendência e mostra eficiência na terapêutica veterinária. O óleo de malaleuca possui diversas propriedades, entre elas, o potencial repelente frente a larvas de carrapatos. O potencial repelente do óleo de malaleuca foi avaliado em duas formulações distintas contendo β-CD, uma de liberação lenta e

outra de liberação rápida modificada, cuja última apresentou maior potencial repelente por maior período de tempo, fornecendo repelência de 99,5 % passados 3 dias da aplicação (YIM et al., 2016).

Experimento realizado com porcos da raça york mostrou que o complexo de inclusão de β-CD contento *Lactobacillus acidophilus* adicionado à dieta desses animais reduziu o colesterol-LDL em 27,9 % quando comparado ao grupo controle de dieta tradicional (ALONSO; FONTECHA; CUESTA, 2016).

O óleo de cúrcuma é um produto natural comumente utilizado em dietas por suas propriedades antimicrobianas, antivirais, entre outras. No entanto, seu uso potencial por via oral em medicina veterinária é severamente prejudicado por seu sabor amargo, baixa solubilidade em água, instabilidade físico-química e baixa biodisponibilidade (ZHAO et al., 2010). Na tentativa de contornar as propriedades indesejáveis foi avaliada a inclusão do óleo de rizoma de cúrcuma associado a β-CD na dieta de suínos. Verificou-se maior aceitabilidade e biodisponibilidade quando comparado a administração do óleo de rizoma de cúrcuma puro (YONG-XUE et al., 2012).

A rutina é um flavonoide que possui ação protetora do endotélio vascular. Ao se comparar os níveis plasmáticos de rutina em cães da raça Beagle, o grupo que ingeriu rutina complexada em HP-β-CD apresentou maior concentração plasmática do flavonoide do que o grupo que ingeriu apenas a rutina, indicando maior biodisponibilidade do composto quando associado as CDs (MIYAKE et al., 2000).

A coenzima Q10 (CoQ10) é um componente essencial da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, essencial para a saúde musculoesquelética, característica importante em animais de esporte. Um estudo realizado na Irlanda, demonstrou que a suplementação oral de CoQ10 complexada com β-CD em potros, da raça puro-sangue-inglês, saudáveis, aumentou significativamente as concentrações plasmáticas médias de CoQ10 (ROONEY et al., 2020).

3.2 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

A criopreservação de espermatozoides é empregada para diversas espécies e apresenta inúmeras vantagens. Esta técnica consiste em armazenar o sêmen a temperatura de -196 °C para estagnar o metabolismo dos espermatozoides, aumentando a longevidade celular (MONTEIRO; SANCLER, 2018). O uso do congelamento de sêmen permite a preservação do material genético por tempo ilimitado, de grande valor na preservação de espécies em processo de extinção (FICKEL; WAGENER; LUDWIG, 2007). Em espécies domésticas, otimiza o uso

do reprodutor, gerando maior número de filhotes com alto valor genético. Além de reduzir os custos e riscos envolvidos no transporte de animais e propagação de doenças, elimina barreiras geográficas, e permite a reprodução de animais incapazes de acasalar por razões físicas ou falecidos (BAILEY; MORRIER; CORMIER, 2003). Entretanto, a criopreservação afeta a integridade do colesterol e dos fosfolipídios na membrana plasmática dos espermatozoides, levando à diminuição da fertilidade do sêmen congelado e descongelado (KHAN et al., 2017).

Estudos demonstraram que o emprego de CDs e/ou CDs complexadas com colesterol melhoraram a qualidade do sêmen pós-descongelamento em várias espécies. A seguir são destacados alguns artigos que abordam este tópico.

3.2.1 Suínos

O congelamento rápido de sêmen de suínos tratados previamente com hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) ou metil-β-ciclodextrina (Me-β-CD), mostrou que a motilidade, a mobilidade progressiva e a velocidade progressiva dos espermatozoides foram significativamente maiores do que na ausência das CDs (ZENG; TERADA, 2001a, 2001b). Entretanto, estudos mais recentes revelam que complexos entre Me-β-CD e colesterol quando empregados no pré-congelamento de espermatozóides suínos, confere maior tolerância osmótica e melhor capacidade de fecundação aos ovócitos *in vitro* (LEE et al., 2015; TOMÁS et al., 2011).

3.2.2 Garanhões

A HP-β-CD adicionada ao sêmen equino pré-congelamento, melhorou significativamente a motilidade espermática pós congelamento, mostrando que mesmo sem estar carreada de colesterol, esta ciclodextrina apresenta-se como aliada na criopreservação de sêmen equino (MADISON; EVANS; YOUNGS, 2013). Em outro estudo o emprego de Me-β-CD carreada de colesterol ajudou a manter a qualidade estrutural dos espermatozoides além de reduzir o processo oxidativo (MURPHY et al., 2014).

Os garanhões considerados “bad cooler”, ou seja, que possuem sêmen de qualidade inferior, são os mais beneficiados pela adição de complexo de inclusão de CDs com colesterol ao sêmen pré-congelamento, apresentando melhora significativa nos parâmetros espermáticos antes do congelamento e após o descongelamento (HARTWIG et al., 2014).

Dentre os equídeos, o sêmen de jumentos é o que mais sofre alterações de perda de qualidade no processo congelamento. Porém, os espermatozoides tratados previamente com Me-β-CD carreadas de colesterol apresentaram maior motilidade e integridade de membrana pós-descongelamento do que os espermatozoides tratados apenas com colesterol (OLIVEIRA et al., 2014).

3.2.3 Ruminantes

As CDs também são eficientes na proteção de espermatozoides bovinos vitrificados (FAYYAZ; AHMAD; AHMAD, 2017). A suplementação do crioprotedor com Me-β-CD carreada de colesterol melhorou significativamente a qualidade espermática após a criopreservação em comparação com sêmen não tratado (EZZ et al., 2017). O mesmo não ocorre quando a Me-β-CD é adicionada pura, o que acarretou danos a membrana e acrossoma dos espermatozoides de touros (LEE et al., 2016).

A combinação de Me-β-CD carreada de colesterol e vitamina E é capaz de proteger os espermatozoides do estresse oxidativo. O tratamento apresentou melhores resultados do que os tratamentos realizados isoladamente ou aos tratamentos sem a ciclodextrina (BENHENIA et al., 2016). Ao se avaliar seis CDs distintas e carreadas com colesterol em sêmen de carneiro, a HP-β-CD apresentou maior efeito protetor e melhora da motilidade antes e posterior ao congelamento, seguido da Me-β-CD (MOCÉ; PURDY; GRAHAM, 2010).

3.2.4 Outras espécies

Galos das raças pradu hang dum e rode ilha vermelha tiveram os espermatozoides tratados com CDs contendo colesterol e apresentaram fertilidade significativamente melhor após o processo de congelamento quando comparados aos espermatozoides não tratados (CHUAYCHU-NOO et al., 2017).

A combinação de complexos de β-CD contendo colesterol e vitamina E melhoraram a qualidade espermática no sêmen de coelhos pós congelamento (NABI et al., 2017).

A Me-β-CD complexada com colesterol também melhora os parâmetros espermáticos pós congelamento de sêmen canino (KHAN et al., 2017). Este efeito é ainda superior quando combinado Me-β-CD com colesterol e a vitamina E (BELALA et al., 2016).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de ciclodextrinas para a formação de complexos de inclusão com moléculas de interesse para o setor veterinário constitui uma opção viável para a melhoria dos produtos e diversificação deste setor. A partir dos resultados dos trabalhos discorridos ao longo deste capítulo observa-se a relevância do uso de ciclodextrinas na medicina veterinária, seja no emprego de medicamentos, nutracêuticos ou como aditivo da criopreservação de espermatozoides. Embora a maioria dos estudos com ciclodextrinas sejam voltados para a saúde humana, a crescente demanda por produtos de uso veterinário é refletida no aumento da receita de vendas líquida ao longo dos anos e aponta para a necessidade de inovações neste setor.

5 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo auxílio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

6 REFERÊNCIAS

ALONSO, L.; FONTECHA, J.; CUESTA, P. Combined effect of *Lactobacillus acidophilus* and β-cyclodextrin on serum cholesterol in pigs. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 115, n. 1, p. 1–5, 2016.

ANDALUZ, A. et al. The effects on cardio-respiratory and acid-base variables of the anaesthetic alfaxalone in a 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPCD) formulation in sheep. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 191, n. 3, p. 389–392, 2012.

BAILEY, J.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. **Canadian Journal of Animal Science**, Otawa, v. 83, n. 3, p. 393–401, 2003.

BEKERS, O. et al. Cyclodextrins in the pharmaceutical Field. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Nova York, v. 17, n. 11, p. 1503–1549, 1991.

BELALA, R. et al. Benefits of cholesterol and α-tocopherol loaded cyclodextrins in dog semen cryopreservation. **Revue de Medecine Veterinaire**, Paris, v. 167, n. 1–2, p. 22–27, 2016.

BENHENIA, K. et al. Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. **Small Ruminant Research**, Arkansas, v. 141, p. 29–35, 2016.

CARVALHO, S. G. et al. Physicochemical and in vitro biological evaluations of furazolidone-based β-cyclodextrin complexes in *Leishmania amazonensis*. **Research in Veterinary Science**, Londres, v. 119, p. 143–153, 2018.

CASTRO-HERMIDA, J. A. et al. Evaluation of β-cyclodextrin against natural infections of cryptosporidiosis in calves. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 85–89, 2001.

CHEW, S. C.; TAN, C. P.; NYAM, K. L. Microencapsulation of refined kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil by spray drying using β-cyclodextrin/gum arabic/sodium caseinate. **Journal of Food Engineering**, Londres, v. 237, p. 78–85, 2018.

CHIU, K. W. et al. The cardiopulmonary effects and quality of anesthesia after induction with alfaxalone in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin in dogs and cats: a systematic review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 525–538, 2016.

CHUAYCHU-NOO, N. et al. Supplementing rooster sperm with Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin improves fertility after cryopreservation. **Cryobiology**, Nova York, v. 74, p. 8–12, 2017.

CRINI, G. et al. Cyclodextrins, from molecules to applications. **Environmental Chemistry Letters**, Collingwood, v. 16, n. 4, p. 1361–1375, 2018.

CUMING, R. S. et al. Development of a sustained-release voriconazole-containing thermogel for subconjunctival injection in horses. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 58, n. 5, p. 2746–2754, 2017.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2007.

DE JESUS, M. B. et al. Theoretical and experimental study of a praziquantel and β-cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and 1H-nuclear magnetic resonance. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 1428–1432, 2006.

ESTES, K. S. et al. A non- surfactant formulation for alfaxalone based on an amorphous cyclodextrin: Activity studies in rats and dogs. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 65, n. 1–2, p. 101–107, 1990.

EVRARD, B. et al. Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropyl-β-cyclodextrin. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 85, n. 1–3, p. 45–50, 2002.

EZZ, M. A. et al. The effect of cholesterol loaded cyclodextrins on post-thawing quality of buffalo semen in relation to sperm DNA damage and ultrastructure. **Reproductive Biology**, Londres, v. 17, n. 1, p. 42–50, 2017.

FAN, G. et al. Comparative muscle irritation and pharmacokinetics of florfenicol-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex freeze-dried powder injection and

florfenicol commercial injection in beagle dogs. **Scientific Reports**, Londres, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

FAYYAZ, M. H.; AHMAD, M.; AHMAD, N. Survival of buffalo bull spermatozoa: effect on structure and function due to alpha-lipoic acid and cholesterol-loaded cyclodextrin. **Andrologia**, Berlim, v. 49, n. 4, p. 1–10, 2017.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, Berlim, v. 53, n. 2, p. 81–89, 2007.

HARTWIG, F. P. et al. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 81, n. 2, p. 340–346, 2014.

HE, Y. et al. Development of water-compatible molecularly imprinted polymers based on functionalized β-cyclodextrin for controlled release of atropine. **Polymers**, Basel, v. 12, n. 1, 2020.

JACOB, S.; NAIR, A. B. Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. **Drug Development Research**, Nova York, v. 79, n. 5, p. 201–217, 2018.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, 2018.

KHAN, J. et al. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on cryosurvival of dog spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlim, v. 52, p. 265–268, 2017.

LEE, S. et al. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the viability and acrosome damage of sex-sorted sperm in frozen-thawed bovine semen. **Journal of Biological Research - Thessalokini**, Thessalokini, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2016.

LEE, Y. S. et al. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 159, p. 124–130, 2015.

LEECE, E. A.; GIRARD, N. M.; MADDERN, K. Alfaxalone in cyclodextrin for induction and maintenance of anaesthesia in ponies undergoing field castration. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 480–484, 2009.

LEHNER, M. A. F. **Liquid preparation comprising a complex of pimobendan and cyclodextrin - EP2089060A1**: Google patents, 2007. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/EP2089060A1/en>. Acesso em: 20 jul. 2020

LI, G. Q. et al. The Curative Effects of Antimycotic and Acaricidal Drugs β-Cyclodextrin Inclusion Complex on the Coinfection of Dermatophyte and Acarid in Rabbits. **Chinese Journal of Veterinary Drug**, Pequim, v. 4, p. 1–5, 2006.

LI, S.; PURDY, W. C. Cyclodextrins and Their Applications in Analytical Chemistry. **Chemical Reviews**, Washington, v. 92, n. 6, p. 1457–1470, 1992.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v. 62, n. 11, p. 1607–1621, 2010.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 329, n. 1–2, p. 1–11, 2007.

MADISON, R. J.; EVANS, L. E.; YOUNGS, C. R. The Effect of 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin on Post-Thaw Parameters of Cryopreserved Jack and Stallion Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, Ely, v. 33, n. 4, p. 272–278, 2013.

MIYAKE, K. et al. Improvement of solubility and oral bioavailability of rutin by complexation with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin. **Pharmaceutical Development and Technology**, Nova York, v. 5, n. 3, p. 399–407, 2000.

MOCÉ, E.; PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, n. 2–4, p. 236–247, 2010.

MONTEIRO, G. A.; SANCLER, Y. F. R. Equine Semen Biotechnology. In: BERGSTEIN-GALAN, T. G. (Ed.). . **Reproduction Biotechnology in Farm Animals Chapter. 1**. ed. Belo Horizonte- Mg, Brasil: Avid Science, 2018. p. 223–260.

MURA, P. et al. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of binary systems of econazole with cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 193, n. 1, p. 85–95, 1999.

MURA, P. Advantages of the combined use of cyclodextrins and nanocarriers in drug delivery: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 579, p. 119181, 2020.

MURPHY, C. et al. Cholesterol-loaded-cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 145, n. 3–4, p. 123–129, 2014.

NABI, I. et al. Interest of Vitamin E and cholesterol preloaded in cyclodextrins on motility of cryopreserved rabbit semen. **Revue de Medecine Veterinaire**, Paris, v. 168, n. 4–6, p. 87–92, 2017.

OLIVEIRA, R. R. et al. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin in donkey semen cryopreservation improves sperm viability but results in low fertility in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlim, v. 49, n. 5, p. 845–850, 2014.

PACHECO, P. A. et al. Inclusion complex and nanoclusters of cyclodextrin to increase the solubility and efficacy of albendazole. **Parasitology Research**, Berlim, v. 117, n. 3, p. 705–712, 2018.

PASLOSKE, K. et al. The bioequivalence of a single intravenous administration of the anesthetic alfaxalone in cyclodextrin versus alfaxalone in cyclodextrin plus preservatives in cats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 437–446, 2018.

PLUMB, D. C. **Plumb's Veterinary Drug Handbook**. 9. ed. Stockholm, Wiscosin: Pharma Vet Inc., 2018.

RODRIGUES, P.; COSTA, R.; KISS, C. Farmacêutica Brasileira Nos Limites Da Subordinação Econômica. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 1, p. 1–22, 2018.

ROMERA, S. A. et al. Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. **Vaccine**, Kidlington, v. 19, n. 1, p. 132–141, 2000.

ROONEY, M. F. et al. Prolonged oral coenzyme Q10-β-cyclodextrin supplementation increases skeletal muscle complex I+III activity in young Thoroughbreds. **Journal of Applied Animal Nutrition**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2020.

SOHADJA, T. **Cyclodextrins in veterinary use** : CycloLab Cyclodextrin Research and Development Laboratory Ltd , [2020] Disponível em: <https://cyclolab.hu/userfiles/CDs in Veterinary Medicine.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2020.

SZEJTLI, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 76, n. 10, p. 1825–1845, 2004.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the reference products: Therefore the increase in number of marketed drug/cyclodextrin formulations is so slow. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Holanda, v. 52, n. 1, p. 1–11, 2005.

TOMÁS, C. et al. Treating boar sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins widens the sperm osmotic tolerance limits and enhances the in vitro sperm fertilising ability. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 129, n. 3–4, p. 209–220, 2011.

TRICARICO, D. et al. Characterization of minoxidil/hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex in aqueous alginate gel useful for alopecia management: Efficacy evaluation in male rat. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 122, p. 146–157, 2018.

VENTURINI, C. D. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

VILLAVERDE, J. et al. Preparation and Characterization of Inclusion Complex of Norflurazon and β-Cyclodextrin to Improve Herbicide Formulations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 4, p. 864–869, 2004.

WANG, D.; CHEN, G.; REN, L. Preparation and Characterization of the Sulfobutylether-β-Cyclodextrin Inclusion Complex of Amiodarone Hydrochloride with Enhanced Oral Bioavailability in Fasted State. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 18, n. 5, p. 1526–1535, 2017.

YIM, W. T. et al. Repellent effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against cattle tick larvae (*Rhipicephalus australis*) when formulated as emulsions and in β-cyclodextrin inclusion complexes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 225, p. 99–103, 2016.

YONG-XUE, S. et al. Pharmacokinetic study of *Rhizoma Curcumae* oil and *Rhizoma Curcumae* oil-β-cyclodextrin inclusion complex in pigs after oral administration**. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 47–51, 2012.

ZADRA, V. F. et al. **Binary Inclusion Complexes of Enrofloxacin in 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin: Preparation and Characterization**. In: World Small Animal Veterinary, 2009, Curitiba. Anais... Curitiba: Association World Congress Proceedings, 2009.

ZENG, W. X.; TERADA, T. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Theriogenology**, StoneHam, v. 55, n. 2, p. 615–627, 2001a.

ZENG, W. X.; TERADA, T. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. **Journal of Andrology**, Filadélfia, v. 22, n. 1, p. 111–118, 2001b.

ZHANG, L. et al. The hydroxypropyl–β-cyclodextrin complexation of toltrazuril for enhancing bioavailability. **Drug design, development and therapy**, Londres, v. 12, p. 583, 2018.

ZHAO, Y. et al. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: Formulation and bioavailability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 383, n. 1–2, p. 170–177, 2010.

Atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente a agentes causadores da mastite bovina

Mikaela Vieira Beloni[1]
Nicolly Soares Ferreira[2]
Juliana Aparecida Severi[3]
Marcelo Henrique Otenio[4]
Mariana Drummond Costa Ignacchiti[5]
Juliana Alves Resende[6]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mikaelabeloni@hotmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ni.colly_ferreira@hotmail.com
[3] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: juseveri@yahoo.com.br
[4] Embrapa Gado de Leite, e-mail: marcelo.otenio@embrapa.br
[5] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: mariana.ignacchiti@ufes.br
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: juliana.resende@ufes.br

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção leiteira é relevante na agropecuária. Em 2018, foram produzidos 33,8 bilhões de litros de leite. Este alimento está como um dos seis produtos mais importante para agricultura, consequentemente gerando uma significativa fonte de renda e emprego para o país (EMBRAPA, 2019).

A mastite bovina é a inflamação da glândula mamária devido ao dano fisiológico, à irritação química ou à infecção microbiana, podendo ocasionar mudanças físico – químicas no leite, como aumento na contagem de células somáticas e alterações nos teores de caseína, cálcio, gordura e lactose. Por essas características a mastite bovina se torna a principal causa de perdas econômicas na produção leiteira no mundo (ASFAW; NEGASH, 2017).

Os impactos causados pela ocorrência da infecção microbiana vão além dos prejuízos econômicos à pecuária leiteira. Isto, porque com o uso indiscriminado de antibióticos, tanto para fins profiláticos como terapêuticos na mastite, tem-se a crescente ocorrência de resistência dos microrganismos a antimicrobianos. Os resíduos de antimicrobianos podem ser encontrados no leite, colocando em risco a saúde do consumidor, logo, torna-se um sério problema na área de saúde pública (GOMES; HENRIQUES, 2015).

Os óleos essenciais representam uma importante fonte renovável e natural com potencial para prospecção de novos compostos com propriedades terapêuticas. Eles são misturas de compostos orgânicos voláteis, produzidos a partir do metabolismo secundário vegetal. Por serem lipofílicos, seus constituintes podem integrar-se às estruturas da membrana celular, causando alterações na permeabilidade, inativação de componentes intracelulares e de enzimas (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

A busca de produtos naturais que apresentem ação antimicrobiana eficiente frente a patógenos resistentes, ou que reduza o longo tempo de tratamentos e toxicidades; ou mesmo melhore, quando usado em associação, a ação dos antimicrobianos comumente usados na clínica, mostra-se como uma alternativa necessária para o controle da mastite. Desta maneira, espécies vegetais representam importante fonte para a busca de novos agentes terapêuticos potenciais. Neste contexto, levando em consideração o potencial antimicrobiano de espécies vegetais, este capítulo tem como objetivo apresentar a utilização de óleos essenciais, na perspectiva da sua utilização como alternativa terapêutica para controle e tratamento da mastite bovina.

2 MASTITE: CARACTERISTICAS GERAIS

A mastite é uma das doenças mais frequentes e onerosas que acomete as vacas leiteiras (JAMALI et al., 2018). Trata-se de uma patologia de natureza recorrente, que causa prejuízos financeiros aos produtores de leite e às indústrias de laticínios em razão das perdas na produção e na qualidade do leite, mortes e abates prematuros de animais afetados e também pelo custo referente ao tratamento (MUSHTAQ et al., 2018). Além disso, a sua importância para a saúde pública não deve ser subestimada.

A mastite bovina é a inflamação da glândula mamária, a qual manifesta-se pelos sintomas inflamatórios (calor, rubor, tumor e dor) nos tetos, por alterações no leite como, aparecimentos de coágulos, alterações de cor e odor e por queda na produção (LOPES et al., 2020). É uma patologia de caráter complexo e multifatorial, envolvendo patógenos, o ambiente e condições inerentes ao animal, o que justifica a complexidade de seu controle e tratamento (MASSOTE et al., 2019; VLIEGHER; OHNSTAD; PIEPERS, 2018).

A patologia pode ser classificada em mastite clínica (MC) e mastite subclínica (MS), com presença de sintomas inflamatórios e ausência dos mesmos, respectivamente (ASHRAF; IMRAN, 2020). Na MC, observam-se sintomas de inflamação mais graves, como temperatura retal elevada, letargia e anorexia, além de notáveis alterações na glândula mamária e no leite. Esta classificação pode assumir a forma subaguda, aguda, superaguda, crônica ou gangrenosa, à medida que os sintomas clínicos se alteram. Enquanto na MS, poucas alterações macroscópicas são visualizadas, havendo apenas modificações químicas e microbiológicas no leite, como altas contagens de células imunológicas e células do epitélio descamado (células somáticas). Esta categoria de mastite é de difícil identificação e cuidado/tratamento, pela quase ausência de sinais e sintomas clínicos e pode afetar cerca de 20 - 50% das vacas de determinado rebanho (BRASIL, 2012; MARTINS et al., 2010).

Diversos agentes etiológicos da mastite já foram descritos, tais como bactérias, micoplasmas, algas e fungos (leveduras e bolores). Os principais são os bacterianos e segundo Gonçalves et al. (2018) eles correspondem a mais de 90% de todos os diagnósticos. Dentre os agentes etiológicos destaca-se: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e bastonetes Gram negativos. Na infecção, o processo inflamatório inicia-se após a invasão das glândulas mamárias seguido da multiplicação nos tecidos produtores de leite (MUSHTAQ et al., 2018).

Segundo Sperandio et al. (2019), na mastite infecciosa, os agentes etiológicos podem ser classificados em contagiosos ou ambientais, conforme sua origem e meio de transmissão (TABELA 1). Essa diferenciação é de importância prática, para se determinar medidas de

controle diferenciadas para cada um desses grupos (BRITO et al., [2020]; VLIEGHER; OHNSTAD; PIEPERS, 2018).

Tabela 1 – Principais agentes etiológicos da mastite bovina.

Patógeno contagioso	**Patógeno ambiental**	
Staphylococcus aureus	*Escherichia coli*	*Enterococcus faecalis*
Streptococcus agalactiae	*Klebsiella* spp.	*Enterococcus faecium*
Streptococcus dysgalactiae	*Citrobacter* spp.	*Aerococcus* spp.
Mycoplasma spp.	*Serratia* spp.	*Pseudomonas* spp.
Corynebacterium spp.**	*Enterobacter* spp.	*Bacillus* spp.
	Proteus spp.	*Arcanobacterium pyogenes*
	Streptococcus uberis	*Prototheca* spp.
	Streptococcus dysgalactiae	*Nocardia* spp.**
	Streptoccocus spp.	

** Baixa prevalência
Fonte: Adaptado de Bogni et al. (2011) e Langoni et al. (2017).

Os patógenos contagiosos são aqueles cujos a via de infecção para o rebanho são o úbere ou lesões nas tetas infectadas e podem se disseminar no rebanho entre as vacas infectadas e sadias durante o manejo de ordenha. Entre esses, a bactéria *S. aureus* é a de maior ocorrência entre os agentes mais comuns (ASHRAF; IMRAN, 2020; CRUZADO-BRAVO et al., 2019; MONISTERO et al., 2020). Importante destacar que, o *S. aureus* coloniza o epitélio das glândulas mamárias, especialmente se a pele estiver lesionada, provocando a inflamação MS de longa duração (COSTA et al., 2017).

Os patógenos ambientais, em geral, são disseminados no solo, por utensílios, dejetos, água ou outros que possam atingir a extremidade da teta. Destaca-se a *E. coli*, que nas infecções mamárias ocorrem sob a forma clínica, de maneira hiperaguda ou aguda, caracterizadas pela difícil resolução terapêutica. Ainda, por este patógeno, é possível a ocorrência de comprometimento sistêmico, e morte ocasional de animais por toxemia (ALMEIDA et al., 2011; ROUSSEL et al., 2017).

3 TRATAMENTO DA MASTITE

O controle e tratamento da mastite é um desafio para os produtores de leite e indústrias de laticínios em todo o mundo. A antibioticoterapia é o método mais comum de tratamento, tornando está patologia a principal causa do uso de antibióticos em vacas leiteiras (GOMES;

HENRIQUES, 2015; SANKAR, 2016). Além dos custos relacionados a gastos com medicamentos e serviços veterinários, esta estratégia terapêutica apresenta complicações relacionadas a baixa taxa de cura, a ocorrência de resistência antimicrobiana e a presença de resíduos de antibióticos no leite (MUSHTAQ et al., 2018; VLIEGHER; OHNSTAD; PIEPERS, 2018). Assim, torna-se eminente a busca por abordagens alternativas para o tratamento de infecções bacterianas em bovinos leiteiros.

Os antibióticos aprovados para o protocolo terapêutico da mastite bovina são: pirlimicina, meticilina, cloxacilina, amoxicilina, novobiocina, penicilina G, di-hidrotreptomicina, cefalpirina e eritromicina (SOUZA et al., 2015). Em geral, a administração destes medicamentos é realizada pela infusão intramamária, o que é considerado essencial para o tratamento destas infecções (MUSHTAQ et al., 2018; VLIEGHER; OHNSTAD; PIEPERS, 2018).

Os microrganismos têm a capacidade de se adaptarem a pressões externas (ação de biocidas e antimicrobianos), de modo a evitar sua extinção. Quando um microrganismo sofre algum estresse que ameaça a sua sobrevivência, geralmente, mecanismos são desenvolvidos ou ativados para resistirem às adversidades impostas pelo ambiente. Ao longo dos anos, o uso extensivo de antimicrobianos levou ao aumento de bactérias resistentes (CENITI et al., 2017; MCEWEN; COLLIGNON, 2018). Diversos são os estudos que associam os antimicrobianos usados na produção animal, com o desenvolvimento de microrganismos resistentes que afetam os seres humanos (BENNANI et al., 2020; LEKSHMI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2020). Considerando que alguns antibióticos administrados a animais podem ser excretados de forma inalterada, incluindo no leite, a preocupação com o impacto potencial de resíduos de antibióticos é crescente. Desta forma, o uso de antibióticos e suas possíveis consequências para a circulação de linhagens resistentes é assunto de grande relevância para o setor agrícola (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

O impacto da presença de microrganismos potencialmente patogênicos e resistentes foi apresentado por Zimermann e Araujo (2017). Os autores isolaram *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *E. coli*, *Yersinia* spp. e *Klebsiela* spp. como agentes causadores de mastite. O *Staphylococcus* spp. apresentou maior prevalência (58,97%) e observaram o predomínio de resistência a penicilina em 47,82% das linhagens de *Staphylococcus* spp.

Alta porcentagem de resistência para penicilina em *S. aureus* (78,9%) e *Staphylococcus* coagulase-negativo (100%) também foi relatado por Dorneles et al. (2019). Ainda neste

trabalho, os autores relatam a ocorrência de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativo multidroga resistentes.

No trabalho de Kurosawa et al. (2020), *Staphylococcus* spp. foram isoladas de amostras de leite de vacas apresentando MC. Nestas linhagens, foram observados perfis de resistência a penicilina (34,48%), oxacilina (20,69%), eritromicina (17,24%), tetraciclina (13,79%) e gentamicina (3,24%), drogas de escolha na terapia humana. Desta forma, estes trabalhos apontam a uma preocupação existente quanto à possibilidade de que o leite possa atuar como fonte de microrganismos resistentes na cadeia alimentar humana.

O número de microrganismos resistentes a múltiplas drogas tem aumentado em todo o mundo, sendo considerado como um problema inerente à terapia antimicrobiana. Por este motivo, é crescente o interesse no desenvolvimento de novos produtos com atividade antimicrobiana (NAZZARO et al., 2017).

4 BIOPROSPECÇÃO DE NOVOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Ao longo dos anos, o conhecimento dos produtos naturais tem sido utilizado como base a fim de promover pesquisas estratégicas para desenvolvimento de novos fármacos, devido à grande diversidade estrutural que pode ser extensivamente explorada para descobertas de novos compostos bioativos (ALMEIDA, 2011; ASHFORTH et al., 2010; MUSHTAQ et al., 2018).

Bioprospecção pode ser definida como uma pesquisa por recursos biológicos naturais e/ou de produtos derivados com finalidades de identificar princípios ativos para a obtenção de novos produtos para exploração comercial por indústria química, farmacêutica, cosmética ou alimentar (AZEVEDO, 2003). Geralmente, a bioprospecção envolve a busca por compostos orgânicos úteis economicamente, a partir de plantas, bactérias, fungos e espécies marinhas.

Historicamente, os produtos naturais atuam como fonte primária para mais de 80% das substâncias terapêuticas, e ainda hoje detém lugar importante no processo de descoberta de novos fármacos. Entre os anos de 1981 e 2006, mais da metade dos medicamentos aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais (NEWMAN; GRAGG, 2012). Além disso, 66% de todos os medicamentos atualmente aprovados como agentes antibacterianos também tem os produtos naturais como fonte (ANAND et al., 2019; BROWN; LISTER; MAY-DRACKA, 2014; MUSHTAQ et al., 2018; NEWMAN; CRAGG, 2012).

As plantas medicinais contêm inúmeros compostos químicos que possuem propriedades biológicas benéficas a saúde, como atividades antibióticas, antineoplásicas, analgésicas,

cardioprotetoras, dentre outras. Assim, as espécies vegetais representam importante fonte de recursos a ser investigado como terapia alternativa ao uso dos antimicrobianos atualmente disponíveis (ANAND et al., 2019).

Os componentes orgânicos produzidos pelas plantas são divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários exercem funções essenciais para sua sobrevivência, como aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos e ácidos nucleicos. Enquanto os metabólitos secundários, se destacam por sua importância para a defesa da planta, protegendo-as contra herbívoros, microrganismos e outras plantas que competem por recursos. Com isso, os metabólitos secundários têm se destacado na área da farmacologia devido a seus efeitos biológicos. Nessa perspectiva, o uso de produtos derivados de plantas medicinais pode representar uma alternativa promissora para o controle da mastite em bovinos leiteiros, com foco em tendências futuras e possíveis implicações no uso desses produtos na área veterinária (LOPES et al., 2020; PAZ et al., 2018).

5 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OE) são compostos aromáticos e voláteis, obtidos de matéria-prima natural de origem vegetal, por destilação a vapor, hidrodestilação, por prensagem mecânica ou com a utilização de solventes orgânicos (RIOS, 2016; TARIQ et al., 2019; WIŃSKA et al., 2019).

Podem estar presentes em todas as partes da planta (flores, folhas, caules, casca, frutos, sementes, bem como na raiz e nos rizomas). Os OE são produzidos e armazenados em estruturas secretoras complexas tais como, tricomas glandulares, células secretoras (idioblasto secretor), glândulas e ductos/canais lisígenos ou esquizolisígenos (RIOS, 2016; TARIQ et al., 2019; WIŃSKA et al., 2019).

Os OE desempenham diferentes papeis nas plantas, por exemplo, em alguns casos eles são usados como atrativo para polinização, em outros casos, são empregados como mecanismo de defesa (repelente ou irritante). Além disso, eles também podem atuar como antioxidantes, antifúngicos e antibacterianos, protegendo a planta de possíveis ataques patogênicos (RIOS, 2016; TARIQ et al., 2019).

A composição química dos OE pode variar de acordo com a parte da planta da qual foram extraídos, fatores genéticos, tipo de solo para cultivo, localização geográfica e condições climáticas (índice pluviométrico, umidade e temperatura). Além disso, fatores como época da

colheita, idade da planta e método de extração utilizado também podem influenciar na produção dos constituintes presentes (REYES-JURADO et al., 2019).

Os OE podem apresentar inúmeros componentes em concentrações bastante diferentes, tendo até três componentes em altas concentrações, denominados majoritários ou principais, e os demais componentes presentes em pequenas quantidades (BAKKALI et al., 2008). Os compostos presentes em quantidade menores em um OE também podem desempenhar papel fundamental na ação antimicrobiana juntamente com os componentes majoritários, caracterizando ação sinergética entre os componentes. Esses compostos combinados podem, em alguns casos, ter atividade maior do que quando utilizado separadamente (LOPES et al., 2020).

6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS OE

Os OE e seus componentes majoritários são potenciais candidatos para o combate as infecções bacterianas, pois apresentam propriedades bacteriostáticas e bactericidas (TARIQ et al., 2019). O mecanismo de ação de um OE depende principalmente da sua composição, da concentração dos seus componentes ativos e de suas interações sinérgicas, ainda, a atividade antimicrobiana varia em função do tipo de OE e/ou do microrganismo. Exemplo disso é observado na atividade dos OE frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Alguns estudos sugerem que em comparação às bactérias Gram-negativas, as bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis aos OE, isso devido as diferenças na parede celular destes microrganismos (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

Os efeitos antibacterianos dos OE são resultado de suas características lipofílicas, o que permite atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática das células bacterianas, alterando a permeabilidade celular. Consequentemente, ocorre o extravasamento de componentes intracelulares e perda de elétrons e íons. Efeitos na redução do potencial de membrana, interrupção das bombas de efluxo e depleção do ATP também são relatados. Estas alterações na bioquímica celular podem causar um efeito em cascata, o que resulta no comprometimento da viabilidade e multiplicação celular (STEVANOVIĆ et al., 2018; TARIQ et al., 2019).

No intuito de avaliar este efeito sobre as linhagens bacterianas, Hall et al. (2020) verificaram que os OE de *Citrus aurantium* e *Melaleuca alternifolia* apresentaram atividade frente a *S. aureus* e *E. coli*. Ainda Reis et al. (2020), relataram elevada atividade antimicrobiana de diferentes OE (*Origanum vulgare*, *Origanum majorana*, *Thymus vulgaris* e *Ocimum*

basilicum) frente a patógenos alimentares, como *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* e *L. monocytogenes*.

Para alguns autores, a atividade antimicrobiana dos OE é determinada por seus componentes majoritários (ČABARKAPA et al., 2019; NOSTRO et al., 2007; SONI et al., 2013). Tal como o timol, um monoterpeno amplamente descrito como componente majoritário do OE de tomilho (*Thymus vulgaris*) e de várias outras espécies vegetais. O timol interage com as proteínas da membrana bacteriana e interfere na expressão de genes envolvidos na síntese de proteínas da membrana externa. Além disso, prejudica a via metabólica do citrato e muitas enzimas envolvidas direta ou indiretamente na síntese de ATP. Desta forma, o timol exerce importante participação na atividade antimicrobiana dos OE nos quais ele aparece como componente majoritário. Contudo, os componentes majoritários dos OE podem não ser o único fator responsável pela atividade inerente aos OE, mas as interações entre esses e os constituintes menores nos OE também são importantes (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

Apesar de todos os benefícios do uso dos OE existem alguns aspectos que são considerados limitantes para o seu uso. Estudos futuros devem abordar principalmente (i) métodos de extração em escala industrial, (ii) desenvolvimento de formulações em concentração adequada e estável, (iii) tóxicologia e mecanismo de ação, (iv) melhores práticas para o uso de tais produtos. Vale ressaltar que embora existam inúmeros estudos demonstrando o potencial antimicrobiano de compostos naturais na produção animal, são limitados os estudos *in vivo* (LOPES et al., 2020).

7 USO DO OE FRENTE A AGENTES CAUSADORES DA MASTITE BOVINA

A atividade de vários OE e seus componentes em diferentes patógenos associados a mastite, está resumida na Tabela 2, conforme observado por diferentes trabalhos *in vitro* entre 2016 - 2020. A maioria dos estudos são frente a *S. aureus*, considerado o principal patógeno da mastite e de difícil controle (NADER et al., 2018).

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos isolados da mastite bovina entre aos anos de 2016 - 2020 (continua).

Óleo Essencial	Microrganismo avaliado	Atividade antimicrobiana			Referência
		Concentração inibitória mínima (CIM)	Concentração bactericida mínima (CBM)	Halo de inibição (mm)	
Achillea millefolium	*S. agalactiae*	4,73 mg/ml	9,46 mg/ml	__	Ebrahimi et al. (2017)
	S. dysgalactiae	4,73 mg/ml	9,46 mg/ml	__	
	E. faecalis	4,73 mg/ml	9,46 mg/ml	__	
	S. aureus	4,73 mg/ml	2,36 mg/ml	__	
Alpinia zerumbet	*S. aureus*	__	__	27 – 35 (100%) 22,5 – 25,0 (50%) 14,3 – 18,8 (25%) 10,8 – 14,9 (12,5%) 7,2 – 10,3 (6,3%)	Castro et al. (2016)
Artemisia spicigera	*S. aureus*	__	__	15 - 30	Mahmoudi et al. (2018)
	E. coli	__	__	9 - 25	

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos isolados da mastite bovina entre aos anos de 2016 - 2020 (continuação).

Óleo Essencial	Microrganismo avaliado	Atividade antimicrobiana			Referência
		Concentração inibitória mínima (CIM)	Concentração bactericida mínima (CBM)	Halo de inibição (mm)	
Cinnamomum cassia	*S. aureus*	0,0125 % v/v	0,05 % v/v	29,6	Zhu et al. (2016)
	S. epidermidis	0,0125 % v/v	0,05 % v/v	19,1	
	S. hyicus	0,00625 % v/v	0,025 % v/v	27,0	
	S. xylosus	0,0125 % v/v	0,05 % v/v	33,3	
	E. coli	0,025 % v/v	0,10 % v/v	30,7	
Citrus sinensis	*S. aureus*	0,02 % (Citral) 0,12 % (Linalol)	—	—	Federman, Ma e Biwas (2016).
Copaifera sp.	*Staphylococcus* coagulase negativo,	≤100 µg/ml – 125 µg/ml	—	—	Faria et al. (2017)
	Corynebacterium spp.	≤100 µg/ml - >1000 µg/ml	—	—	
Ferulago angulata	*S. aureus*	4 % v/v	6% v/v	14,8 (10%) 19,2 (15%) 24,4 (20%)	Bohlouli e Hasanvand (2019)

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos isolados da mastite bovina entre aos anos de 2016 - 2020 (continuação)

Óleo Essencial	Microrganismo avaliado	Atividade antimicrobiana			Referência/ País
		Concentração inibitória mínima (CIM)	Concentração bactericida mínima (CBM)	Halo de inibição (mm)	
Melaleuca armillaris	*S. aureus*	12,5 µl/ml (pH 7,4)	25 – 50 µl/ml (pH 7,4)	—	Buldain et al. (2020)
		12,5 µl/ml (pH 6,5)	25 µl/ml (pH 6,5)	—	
		6,25 µl/ml (pH 5,0)	12,5 – 25 µl/ml (pH 5,0)	—	
Minthostachys verticillata	*S. uberis*	14,3 a 114,5 mg/ml (1,56-12,5% v/v)	114,5 e 229 mg/ml (12,5-25 % v/v)	—	Montironi, Cariddi e Reinoso (2016)
	E. coli	0,9 a 14,5 mg/ml	—	—	Ceriolli et al. (2018)
	Bacillus pumilus	1,8 a 29,0 mg/ml	—	—	
	E. faecium	3,6 mg/ml	29 mg/ml	—	

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos isolados da mastite bovina entre aos anos de 2016 - 2020 (conclusão).

Óleo Essencial	Microrganismo avaliado	Atividade antimicrobiana			Referência
		Concentração inibitória mínima (CIM)	Concentração bactericida mínima (CBM)	Halo de inibição (mm)	
Salvia officinalis	*S. epidermidis*	__	__	12	Alekish et al. (2018)
	Proteus vulgaris	__	__	12	
	Corynebacterium s	__	__	12	
	S. cromogenes	__	__	11	
	E. coli	__	__	7	
	P. aeruginosa	__	__	8	
	S. hyicus	__	__	8	
	Acinetobacter sp.	__	__	9	
	S. uberis	__	__	9	
	S. aureus	__	__	9	
Tagetes minuta L	*S. aureus*	1 mg/ml	__	__	Sperandio et al. (2019)
	E. coli	3 mg/ml			
Thymus fontanesii	*S. aureus*	0,625 µl/ml	1,25 µl/ml	35	Elhouda, Kheira e Samia (2020).
	E. coli	0,625 µl/ml	1,25 µl/ml	23,33	

Fonte: O autor.

É possível observar que existe uma falta de uniformização de técnica para avaliação da atividade antimicrobiana o que pode influenciar nos resultados obtidos. Vale ressaltar que fatores como a origem da planta, o período de coleta, a parte da planta utilizada, o estágio de desenvolvimento da planta, interações entre planta-planta e técnicas de extração e estocagem podem promover diferenças na composição química e nas concentrações relativas dos componentes dos OE. Além disso, na avaliação da atividade antimicrobiana, os resultados podem ser influenciados pelas características do microrganismo avaliado, tempo de leitura e meio de cultura utilizado (LOPES et al., 2020).

Alguns estudos demonstram que o OE foi capaz de afetar a formação do biofilme bacteriano (CERIOLLI et al., 2018; FEDERMAN; MA; BIWAS, 2016; MONTIRONI; CARIDDI; REINOSO, 2016). É amplamente reconhecido que, em resposta a diferentes condições ambientais, as bactérias podem formar biofilmes e, esta estratégia de sobrevivência e persistência no ambiente pode ocasionar resistência a antimicrobianos e biocidas, limitando o tratamento (SATPATHY et al., 2016).

Uma revisão realizada por Lopes et al. (2020), mostrou que entre os anos de 2001 a 2015, vários OE foram avaliados contra microrganismos isolados da mastite bovina, e muitos deles apresentaram propriedades antimicrobianas. Porém, não foram encontrados trabalhos recentes avaliando a atividade antimicrobiana de muitos desses OE, tais como OE de *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-índia), *Thymus vulgaris* L (Tomilho), *Origanum vulgaris* (Orégano) e *Cymbopogon citratus* (Capim-limão) contra os microrganismos da mastite bovina.

Embora existam inúmeros artigos discutindo o potencial dos compostos naturais como alternativas aos antimicrobianos na produção animal, apenas um número limitado de estudos fornece evidências científicas relevantes. Na maioria das vezes, o composto natural é mencionado em apenas uma pesquisa e os ensaios clínicos são escassos ou fornecem poucos dados demonstrando eficácia (LOPES et al., 2020). É necessária a realização de mais estudos com os OE e seus componentes majoritários, direcionados aos microrganismos da mastite bovina, de forma a consolidar esses compostos como alternativas terapêuticas para o tratamento das infecções intramamárias em bovinos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dado o seu caráter complexo e multifatorial, a mastite bovina é uma doença de difícil controle e tratamento, gerando prejuízos financeiros aos produtores de leite e para as indústrias

de laticínios. Por esse motivo, novos estudos têm sido desenvolvidos na busca de tratamentos alternativos para as infecções bacterianas, baseados principalmente na utilização de extratos vegetais e OE, e muitos dos estudos *in vitro* já demonstraram efeito antimicrobiano em dose pequenas, o que incentiva o desdobramento de pesquisas adicionais (LOPES et al., 2020).

Apesar de suas características antimicrobianas serem conhecidas, os OE apresentam características, lipofilicidade e alta volatilidade, que dificultam a sua incorporação e estabilidade em formulações de matrizes aquosas, se tornando um desafio a mais aos formuladores. Além disso, a introdução direta de óleos essenciais na dieta dos animais resultou em sabor e aroma distinto nas amostras de leite de animais tratados (LEJONKLEV et al., 2016). Desta forma, a formulação a base de óleo essencial ainda tem como importante discussão garantir as características organolépticas do leite.

Vale ressaltar também que para a produção dos OE em grande escala é necessário o acesso a grande quantidade de biomassa vegetal, o que pode representar outro obstáculo à aplicabilidade dessas técnicas alternativas (LOPES et al., 2020). Assim, torna-se importante a avaliação da propriedade antimicrobiana dos componentes majoritários dos OE visando a produção em grande escala, uma vez que esses compostos podem ser obtidos sinteticamente e podem ser responsáveis por grande parte da atividade biológica dos óleos. Além disso, uma vez comprovada a atividade antimicrobiana do componente majoritário, pode-se, a partir deste, criar novas moléculas semissintéticas que poderiam ter a atividade antimicrobiana realçada a partir de pequenas modificações químicas na sua estrutura (síntese de biomoléculas).

Ainda, a associação dos OE com os antibióticos tradicionalmente usados no tratamento da mastite, é uma estratégia terapêutica a ser avaliada. Esta associação pode induzir uma redução na concentração inibitória mínima dos antibióticos, além de promover efeito sinérgico ou aditivo de sua propriedade antimicrobiana, aumentando o efeito microbicida dos antibióticos (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

Desta forma, os OE podem ser vistos como potenciais fontes para o desenvolvimento de novas moléculas semissintéticas que possam auxiliar no controle de microrganismos, minimizando efeitos de resistência e auxiliando na terapêutica medicamentosa animal e humana. Os resultados obtidos com pesquisa nesta área poderão contribuir com o desenvolvimento e incorporação de novas tecnologias aplicadas a saúde.

9 REFERÊNCIAS

ALEKISH, M. O. et al. Antibacterial activity of sage essential oil against common mastitis causing bacterial isolates from bovine clinical mastitis. **Global Veterinaria**, Dubai, v. 20, n. 6, p. 247-251, 2018.

ALMEIDA, M. A. de. **Plantas medicinais**. 3. ed. Salvador: Editora da Universidade Federal da Bahia, 2011.

ALMEIDA, R. et al. Intracellular fate of strains of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with acute or chronic mastitis. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 35, p. 89–101, 2011.

ANAND, U. et al. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. **Metabolites**, Basileia, v. 9, n. 11, p. 258 - 271, 2019.

ASFAW, M.; NEGASH, A. Review on impact of bovine mastitis in dairy production**.** **Advances in Biological Research**, Goa, v. 11, n. 3, p. 126-131, 2017.

ASHFORTH, E. J. et al. Bioprospecting for antituberculosis leads from microbial metabolites. **Natural Product Reports**, Londres, v. 27, n. 11, p. 1709-1719, 2010.

ASHRAF, A.; IMRAN, M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Animal Health Research Reviews**, Cambridge, v. 20, p. 1-14, 2020.

AZEVEDO, C. M. A. Bioprospecção: Coleta de material biológico com finalidade de explorar os recursos genéticos. **UNESCO**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 35, 2003.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils–a review. **Food and Chemical Tóxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BENNANI, H. et al. Overview of evidence of antimicrobial use and antimicrobial resistance in the food chain. **Antibiotics**, Basileia, v. 9, n. 2, p. 49, 2020.

BOGNI, C. et al. War against mastitis: current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. In: VILAS, A. M. **Science Against Microbial Pathogens:** communicating current research and technological advances. Badajoz: Formatex, 2011. p. 483-494.

BOHLOULI, S.; HASANVAND, S. Evaluation of antimicrobial effect of *Ferulago angulata* on *Staphylococcus aureus* growth isolated from subclinical mastitis, *in vitro* Study. **Journal of Clinical Research in Paramedical Sciences**, Kermanshah, v. 9, n. 1. p. 1-6, 2019.

BRASIL. Governo do Brasil. Ministério da Educação. Mastite bovina: controle e prevenção. **Boletim Técnico**, Lavras, n. 93, p. 1-30, 2012.

BRITO, M. A. et al. **Mastite**: Agência de Informação Embrapa. Brasília: Embrapa. Disponível em:

<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_202_21720039247.html> Acesso em: 21 jul. 2020.

BROWN, D. G.; LISTER, T.; MAY-DRACKA, T. L. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 413-418, 2014.

BULDAIN, D. et al. *Melaleuca armillaris* essential oil in combination with rifaximin against *Staphylococcus aureus* isolated of dairy cows. **Frontiers in Veterinary Science**, Mineápolis, v. 7, n. 344, p. 1-10, 2020.

ČABARKAPA, I. et al. Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella Enteritidis*. **Biofouling**, Londres, v. 35, n. 3, p. 361-375, 2019.

CASTRO, K. N. C. et al. Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, Vila Mariana, v.83, p. 1-7, 2016.

CENITI, C. et al. Phenotypic antimicrobial resistance profile of isolates causing clinical mastitis in dairy animals. **Italian Journal of Food Safety**, Pavia, v. 6, n. 2, p. 84 – 86, 2017.

CERIOLLI, M. F. et al. Effect of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) epling and limonene on biofilm production in pathogens causing bovine mastitis. **Frontiers in Veterinary Science**, Mineápolis, v. 5, n. 146, p. 1 – 8, 2018.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. **Medicines**, Basileia, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.

COSTA, H. N. et al. Estimativa das perdas de produção leiteira em vacas mestiças Holandês x Zebu com mastite subclínica baseada em duas metodologias de análise. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 69, n. 3, p. 579-586, 2017.

CRUZADO-BRAVO, M. L. M. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis milk and cheese processing: study of adherence and biofilm formation. **Food Research International**, Essex, v. 122, p. 450-460, 2019.

DORNELES, E. M. S. et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. **Microbiology Open**, Londres, v. 8, n. 5, p. 1-7, 2019

EBRAHIMI, K. A. et al. Investigation of antibacterial activity of essential oil from arial part of *Achellia millefolium* against some gram-positive bacteria isolated from bovine mastitis in shahrekord district. **Veterinary Researches & Biological Products**, Karaj, v. 30, n. 3; p. 78 - 84. 2017.

ELHOUDA, B. A N.; KHEIRA, G.; SAMIA, M. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* responsible for bovine mastitis sensitivity to the essential oil of Algerian *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. **Acta Scientifica Naturalis**, Shumen, v. 7, n. 1, p. 26-32, 2020.

EMBRAPA, GADO DE LEITE. **ANUÁRIO leite 2019:** novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2019.

FARIA, M. J. M. de et al. Antimicrobial activity of *Copaifera* spp. against bacteria isolated from milk of cows with mastitis. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 18, p. 1-14, 2017.

FEDERMAN, C.; MA, C.; BISWAS, D. Major components of orange oil inhibit *Staphylococcus aureus* growth and biofilm formation, and alter its virulence factors. **Journal of Medical Microbiology**, Edimburgo, v. 65, n. 7, p. 688-695, 2016.

GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. **Current Microbiology**, Nova York, v. 72, n. 4, p. 377-382, 2015.

GONÇALVES, J. L. et al. Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. **Livestock Science**, Wageningen, v. 210, p. 25-32, 2018.

HALL, M. C. et al. Evaluation of antimicrobial activity of *Nerol* and *Melaleuca* essential oils pure and microencapsulated. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 3, n. 4, p. 5331-5345, 2020.

JAMALI, H. et al. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 101, n. 6, p. 4729-4746, 2018.

KUROSAWA, L. S. et al. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus s*pp. associados a mastite bovina. **PUBVET**, Maringá, v. 14, n. 5, p. 1-6, 2020.

LANGONI, H. et al. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, 2017.

LEJONKLEV, J. et al. Effect of oregano and caraway essential oils on the production and flavor of cow milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 10, p. 7898-7903, 2016.

LEKSHMI, M. et al. The food production environment and the development of antimicrobial resistance in human pathogens of animal origin. **Microorganisms**, Basileia, v. 5, n. 1, p. 11, 2017.

LOPES, T. S. et al. Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, Londres, v. 131, p. 186 – 193, 2020.

MAHMOUDI, R. et al. The effects of *Artemisia spicigera* essential oil before and after flowering against bovine mastitis bacteria. **International Journal of Food Nutrition and Safety**, Genebra, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2018.

MARTINS, R. P. et al. Prevalência e etiologia infecciosa de mastite bovina na microrregião de Cuiabá-MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MASSOTE, V. P. et al. Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária do Sul de Minas**, Varginha, v. 1, n. 1, p. 41-54, 2019.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial resistance: a one health perspective. **Microbiology Spectrum**, Washington, v. 6, n. 2, p. 1-26, 2018.

MONISTERO, V. et al. Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 103, n. 4, p. 3431-3446, 2020.

MONTIRONI, I. D.; CARIDDI, L. N.; REINOSO, E. B. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 48, n. 3, p. 210-216, 2016.

MUSHTAQ, S. et al. Bovine mastitis: an appraisal of its alternative herbal cure. **Microbial Pathogenesis**, Londres, v. 114, p. 357-361, 2018.

NADER, T. T. et al. Antibiofilm activity of *Croton urucurana* compounds against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis in dairy cattle. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 9, p. 1713-1719, 2018.

NAZZARO, F. et al. Essential oil sand antifungal activity. **Pharmaceuticals,** Basileia, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, Edimburgo, v. 56, n. 4, p. 519-523, 2007.

OLIVEIRA, N. A. et al. Use of antibiotics in animal production and its impact on human health. **Journal of Food Chemistry and Nanotechnology**, Wanju-gun, v. 6, n. 1, p. 40-47, 2020.

PAZ, J. E. W. et al. Phenolic content and antibacterial activity of extracts of *Hamelia patens* obtained by different extraction methods. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 49, n. 3, p. 656-661, 2018.

REIS, J. B. et al. Evaluation of antimicrobial activity of essential oils against food pathogens**.** **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 342-363, 2020.

REYES-JURADO, F. et al. Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 60, n. 10, p. 1641-1650, 2019.

RIOS, J. L. Essential Oils: what they are and how the terms are used and defined. In: PREEDY, V. R. **Essential oils in food preservation, flavor and safety**. 1 ed. Londres: Academic Press, 2016. p. 3-10.

ROUSSEL, P. et al. *Escherichia coli* mastitis strains: *in vitro* phenotypes and severity of infection *in vivo*. **PloS ONE**, São Francisco, v. 12, n. 7, p. 1-20, 2017.

SANKAR, P. New therapeutic strategies to control and treatment of bovine mastitis. **Veterinary Medicine Open Journal**, Taipé Chinesa, v. 1, n. 2, p. 7-8, 2016.

SATPATHY, S. et al. Review on bacterial biofilm: an universal cause of contamination. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Taichung, v. 7, p. 56-66, 2016.

SONI, K. A. et al. Inhibition and inactivation of *Salmonella Typhimurium* biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 76, n. 2, p. 205-212, 2013.

SOUZA, G. N. de. et al. Circular Técnica 108: avaliação de informações técnicas contidas nas bulas dos antimicrobianos indicados para mastite bovina como método auxiliar na definição de protocolos de tratamento. **Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora, v. 1, p. 1-8, 2015.

SPERANDIO, J. et al. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro* do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. visando à aplicação no controle da mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 71, n. 4, p. 1251-1259, 2019.

STEVANOVIĆ, Z. D. et al. Essential oils as feed additives — future perspectives. **Molecules**, Basileia, v. 23, n. 7, p. 1717, 2018.

TARIQ, S. et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, Londres, v. 134, n. 103580, p. 1-20, 2019.

VLIEGHER, S. de.; OHNSTAD, I.; PIEPERS, S. Management and prevention of mastitis: a multifactorial approach with a focus on milking, bedding and data-management. **Journal of Integrative Agriculture**, Pequim, v. 17, n. 6, p. 1214-1233, 2018.

WIŃSKA, K. et al. Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative?. **Molecules**, Basileia, v. 24, n. 11, p. 1-21, 2019.

ZHU, H. et al. Bactericidal effects of *Cinnamon cassia* oil against bovine mastitis bacterial pathogens. **Food Control**, Surrey, v. 66, p. 291-299, 2016.

ZIMERMANN, K. F.; ARAUJO, M. E. M. Mastite bovina: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos. **Campo Digital**, Campo Mourão, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2017.

Pesquisa de produtos naturais para cicatrização de feridas

Elisabeth Maria López de Prado[1]
Luiza Laura de Souza Oliveira[2]
Márian de Jesus Pereira[3]
Maxwell Feliciano Simões[4]
Rodolfo Moreira Baptista[5]
Shaira Grulke Ribeiro[6]
Talita de Cássia Pena Pastore[7]
Juliana Aparecida Severi[8]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: elisabeth.prado7@gmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: lsouluiza15@gmail.com
[3] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: marianjesuspereira@hotmail.com
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mxw.feliciano@gmail.com
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: rodolfombaptista@outlook.com
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: shairagrulker25@outlook.com
[7] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: talitacassia6@gmail.com
[8] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: juseveri@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Feridas podem ser definidas como interrupções na continuidade do tecido cutâneo. De acordo com o tempo gasto para a cicatrização, podem ser classificadas como agudas ou crônicas, estas últimas apresentando maior tempo até a cura (COSTA et al., 2020).

A cura de feridas é um processo importante para restaurar as funções anatômicas e fisiológicas dos tecidos (BOYKO; LONGAKER; YANG, 2017). O tratamento eficaz diminui o tempo para retornar à função normal e melhora a aparência estética final, promovendo o bem-estar e a saúde dos pacientes (LIPTAK, 1997). Pode ocorrer por regeneração, com reposição do tecido original, ou por cicatrização, com substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo vascularizado (BRASILEIRO FILHO, 2009).

A cicatrização de feridas é um processo biológico complexo, mediado por fatores de crescimento, citocinas e pode ser dividido em fases, embora essas possam se sobrepor e ocorrer simultaneamente. A primeira fase é inflamatória, com liberação de mediadores e reabsorção dos produtos de destruição tecidual pelas células fagocitárias. Na fase proliferativa há formação do tecido de granulação, com neovascularização, proliferação de células endoteliais e fibroblásticas e deposição de colágeno. Na fase de remodelação, ocorre a contração da ferida pela ação dos miofibroblastos e o remodelamento do tecido, com substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; KUMAR, 2010).

Pesquisas recentes têm priorizado o desenvolvimento de materiais naturais e sintéticos que aumentem a taxa de cicatrização de feridas ou eliminem as possíveis complicações do processo de cicatrização (HANANEH; ISMAIL; ALSHEHABAT, 2015). Atualmente, a ação cicatrizante de inúmeras plantas foi comprovada, sendo relacionada a diferentes classes de compostos bioativos, dentre eles os taninos, flavonoides, saponinas triterpênicas, óleos essenciais e mucilagens (FERRERO, 2006).

A pesquisa da atividade de um produto natural no reparo e cicatrização de tecidos envolve diversas áreas de conhecimento. Existem inúmeras metodologias disponíveis, desde modelos computacionais, ensaios *in vitro*, diversos modelos animais e até mesmo estudos em humanos (UD-DIN; BAYAT, 2017). Cada pesquisador precisa escolher os métodos mais adequados, de acordo com os objetivos da pesquisa e as metodologias disponíveis (BOYKO; LONGAKER; YANG, 2017). O desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de feridas é geralmente realizado por meio de várias etapas, começando com testes *in vitro*, estudos pré-clínicos e, finalmente, ensaios clínicos (IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016).

O objetivo do presente capítulo é abordar algumas das etapas e metodologias experimentais utilizadas na pesquisa de novos produtos para a cicatrização e reparo de feridas, dando ênfase aos produtos naturais. Como proposta de estudo, foi abordada inicialmente a escolha da espécie vegetal e os principais compostos bioativos com ação no reparo de feridas. Em relação a avaliação da atividade cicatrizante, foram discutidos ensaios *in vitro*, como o *scratch assay*, e os modelos animais. Foram mencionados ainda, ensaios relacionados a outras atividades benéficas ao processo de cicatrização, como a determinação de ações antioxidante e antimicrobiana. Finalmente, foram apresentadas brevemente as diversas formas farmacêuticas utilizadas como coberturas para feridas.

2 BIOATIVOS CICATRIZANTES

O primeiro passo para a realização da pesquisa de produtos naturais com ação cicatrizante é a definição da espécie vegetal que será objeto de estudo. Isso pode ser feito a partir de levantamentos etnofarmacológicos acerca de plantas medicinais com tal efeito (ELISABETSKY; SOUZA, 2003). Também deve-se compreender a composição química e atividades farmacológicas evidenciadas cientificamente, bem como definir a forma de preparo do extrato vegetal a ser investigado. Outra abordagem para identificação da espécie vegetal a ser investigada consiste na identificação das substâncias bioativas presentes, já que há vasta literatura relacionada à ação cicatrizante de certos grupos de produtos naturais. Conhecer os bioativos presentes torna possível relacionar os mecanismos de ação observados à presença desses compostos (THAKUR et al., 2011).

Taninos são compostos polifenólicos de alto peso molecular, derivados tanto da condensação de unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol, quanto da esterificação de grupos OH- de um poliol central, como a glicose, por unidades de ácido gálico. São classificados entre taninos condensados e hidrolisáveis, respectivamente. A ação cicatrizante destes compostos é propiciada por sua capacidade de complexar com macromoléculas, como proteínas, resultando na formação de uma espécie de rede no local da lesão. Tal ação isola a ferida do ambiente e reduz a permeabilidade de exsudatos (OLIVEIRA et al., 2010). Outro mecanismo está relacionado à atividade angiogênica, posto que estimulam o fator de crescimento de células endoteliais, favorecendo o desenvolvimento do tecido de granulação (LU et al., 2004). Também exibem ação antimicrobiana, complexam com íons metálicos e combatem radicais livres, o que corrobora com o uso no tratamento de feridas (MELO; SANTOS, 2017).

Flavonoides são polifenóis biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e que exibem esqueleto tipo C_6-C_3-C_6. As ações antimicrobiana e antioxidante dessa classe são bem exploradas no contexto da cicatrização. Os radicais livres prejudicam a regeneração da região lesionada, ao passo que a ação antioxidante dos flavonoides permite a melhor recuperação do tecido por meio da sua eliminação (MENEZES, 2005; WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). A ação antimicrobiana é propiciada pela capacidade de ligação com substâncias da membrana plasmática de bactérias e de complexação com proteínas solúveis no meio extracelular (COWAN, 1999). Ainda, exibem a capacidade de aumentar o número de fibroblastos nos tecidos (D'ACAMPORA et al., 2007) e de modular o processo inflamatório (VIEIRA et al., 2008).

As saponinas são heterosídeos esteroidais ou triterpênicos. Caracterizam-se pelo caráter anfifílico, que se deve ao núcleo terpênico policíclico e à inserção glicídica. Apresentam ação tensoativa, ocasionando formação de espuma sob agitação em solução aquosa. Também atuam sobre membranas, enzimas e complexam com esteroides (DINIZ, 2006). Estudos mostram efeitos benéficos de saponinas triterpênicas no processo de cicatrização por aumentar a produção de fibronectina pelos fibroblastos humanos, por meio de alterações metabólicas na matriz extracelular e por estímulo angiogênico devido ao aumento da concentração do ativador de plasminogênio (KANZAKI et al., 1998; MORISAKI et al., 1995). Outros estudos demonstram também aumento na proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e modulação das células inflamatórias (LU et al., 2004; SHUKLA et al., 1999).

Os óleos essenciais são misturas de compostos voláteis, lipofílicos e frequentemente aromáticos, obtidos por destilação por arraste com vapor d'água ou por espremedura dos pericarpos de frutos cítricos. São constituídos por terpenos, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, fenóis, dentre outros (HEINZMANN; SPITZER; SIMOES, 2017). O efeito cicatrizante dos óleos essenciais tem sido relacionado à ações diversas. O óleo essencial de *Mauritia flexuosa* demonstrou efeito antimicrobiano, fortaleceu a barreira hidrolipídica da pele, promovendo proteção contra a radiação UV e propiciando melhor regeneração de regiões lesionadas (ZANATTA et al., 2010). Também houve maior contração das feridas e maior proliferação de fibroblastos (BATISTA et al., 2012). O óleo essencial de *Ruta graveolens* apresentou aumento na reparação tecidual e na quantidade de fibroblastos (PISTORE et al., 2014).

As mucilagens são polissacarídeos com alta massa molecular, resultantes da condensação de unidades glicídicas. Possuem a capacidade de formarem soluções viscosas ou géis ao entrarem em contato com a água, apresentando propriedades umectantes e protetoras de mucosas (NIEHUES et al., 2015). Por isso são muito exploradas em feridas por queimaduras,

por manter a hidratação do local lesionado. Estudos realizados com mucilagem de *Aloe vera* L. demonstraram também efeitos de aumento dos fibroblastos, de células epiteliais e da vascularização, com melhora da microcirculação cutânea (CAGNI; LUBI, 2018; MAENTHAISONG et al., 2007).

3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE

Os ensaios *in vitro* são úteis para o rastreamento inicial de novos produtos que atuem sobre a reparação de dano tecidual. Permitem evidenciar elementos específicos relacionados à cicatrização sob um conjunto experimental mais simples, tornando mais fácil a interpretação dos resultados. As vantagens desses estudos incluem: custo e tempo para execução de ensaios reduzidos, conveniência, reprodutibilidade e capacidade de fornecer informações importantes sobre a função potencial de cada tipo celular (PEREZ; DAVIS, 2008).

Entretanto, há desvantagens quando os ensaios são replicados *in vivo*, posto que são incapazes de reproduzirem completamente as condições biológicas e eventos envolvidos na cicatrização, nos quais há vários tipos de células envolvidas, interagindo entre si e desempenhando papéis diversos em diferentes momentos durante o processo. Além disso, existem outros fatores que influenciam o reparo dos tecidos, como a matriz extracelular e seus componentes, múltiplas citocinas, fatores de crescimento, proteases, pH, oxigenação, temperatura, estado de saúde do indivíduo, ocorrência de infecção, dentre outros, que não são observáveis nos modelos *in vitro* (GREENHALGH, 2005; IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016).

São muitas as metodologias que possibilitam examinar os diversos componentes envolvidos na reparação de tecidos, tais como, formação de cicatrizes, angiogênese, reepitelização ou contração. Para avaliar a formação de cicatrizes, pode-se examinar a produção da matriz extracelular por fibroblastos ou outras células, em resposta a estímulos específicos. A angiogênese pode ser medida isolando células endoteliais a partir de tecidos, como a veia umbilical humana ou a membrana corioalantóide do ovo de galinha. Fibroblastos e queratinócitos podem ser isolados da pele e a taxa de migração e proliferação dessas células é determinada por várias técnicas (GREENHALGH, 2005). Um dos modelos de migração e proliferação mais utilizados é o *scratch assay* (BOYKO; LONGAKER; YANG, 2017).

Trata-se de um método que possibilita avaliar a proliferação e motilidade celular *in vitro* que ocorrem após a criação de um risco ou arranhão (*scratch*) em uma monocamada celular confluente (TODARO; LAZAR; GREEN, 1965). As células na borda do espaço recém-criado

mover-se-ão para a abertura até que os contatos célula-célula sejam estabelecidos novamente e o arranhão seja fechado, tal como ilustrado na Figura 1 (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

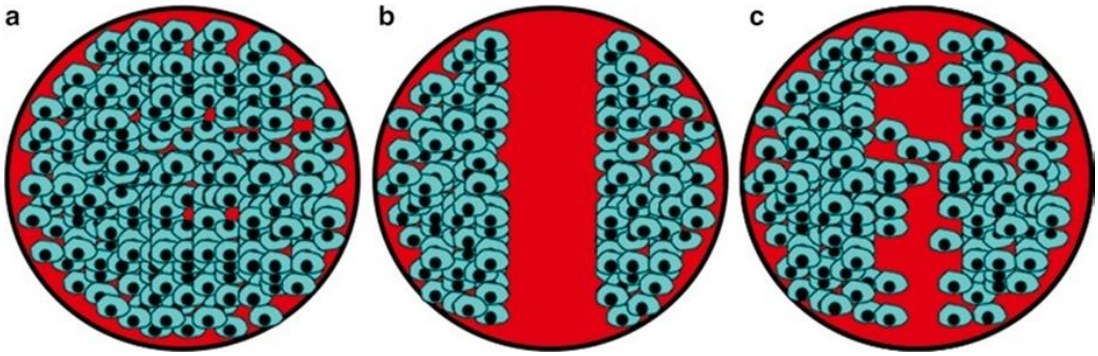

Figura 1 – Representação das etapas do método de *scratch assay*, no qual (a) representa uma cultura celular confluente, (b) o arranhão na superfície e (c) a regeneração da monocamada celular.
Fonte: Moutasim, Nystrom e Thomas (2011).

Inicialmente as placas de cultura são revestidas com os substratos adequados para o tipo celular selecionado. Em seguida, as células são cultivadas até a formação de uma monocamada confluente, sendo então incubadas durante cerca de 6 horas (37 °C). Ocorrerá sua adesão e espalhabilidade ao substrato. A superfície da monocamada é raspada com dispositivos de borracha ou ponta de micropipeta, removendo assim as células e criando um “arranhão”. A taxa na qual as células se dividem e migram para a área raspada é determinada microscopicamente, por meio da captura de imagens no tempo zero e em intervalos regulares de 12 a 24 horas (UD-DIN; BAYAT, 2017).

Os fibroblastos são mais comumente utilizados neste modelo por serem o tipo celular predominante na cicatrização de feridas. Porém, queratinócitos também podem ser usados, pois estão relacionados ao processo de reepitelização (BOYKO; LONGAKER; YANG, 2017). Outros processos fisiológicos também podem ser analisados neste modelo, incluindo produção e secreção de proteínas, viabilidade, diferenciação e expressão gênica (UD-DIN; BAYAT, 2017).

Apesar das inúmeras aplicabilidades da técnica, há fatores negativos relacionados, tais como, a dificuldade em produzir uma monocamada de células de dimensões e posicionamento uniformes dentro de um poço de microplaca. Além disso, as células danificadas pelo processo do arranhão podem liberar fatores apoptóticos e outras citocinas, o que poderia afetar as vias de transdução dos sinais celulares relacionadas ao fechamento da ferida (GOUGH et al., 2011).

Os modelos animais são o próximo passo para estudar a eficácia de um produto, propiciando uma visão mais completa dos seus efeitos no processo de cicatrização, com a

avaliação de inúmeros parâmetros (PEREZ; DAVIS, 2008). Também são parte integrante da investigação sobre a segurança e irritabilidade do produto. São importantes para determinar qualquer efeito deletério sobre os tecidos que o produto em estudo possa induzir, prolongando o período de cicatrização da ferida ou apresentando resultado final inferior (IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016).

Os experimentos devem ser realizados de acordo com as normas de ética em experimentação animal, observando os parâmetros exigidos pelos comitês internacionais e nacionais de ética e bem-estar animal, como condições de biossegurança, transporte, aclimatação, acomodação, higiene, dieta e hidratação. Também precisam ser observados os procedimentos técnicos e cirúrgicos, como anestesia, materiais e instrumentos utilizados, bem como os cuidados pós-operatórios (MASSAHUD-JÚNIOR; SALOMÉ, 2016). Sempre que possível, recomenda-se a aplicação do conceito dos 3 R, introduzido em 1959 por Russel e Burch: r*eplacement* – substituição de espécie por outra mais abaixo na escala zoológica; r*eduction* – redução do número de animais utilizados; r*efinement* – refinamento das técnicas para minimizar o nível de estresse e dor causada aos animais durante a experimentação (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

A literatura descreve diferentes modelos animais de cicatrização de feridas: agudos (incisionais, excisionais, queimaduras e outros), crônicos (úlceras por pressão ou isquêmicas) e relacionados a patologias induzidas (diabetes, neoplasias, deficiências imunológicas), dentre outros (GALIANO et al., 2004; PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010).

Os modelos incisionais (FIGURA 2a) são utilizados para testar a "força tênsil" da cicatriz. É feita uma incisão na pele, geralmente utilizando bisturi ou tesoura, que em seguida é fechada com grampos ou suturas ou deixada fechar espontaneamente. Após determinado intervalo de tempo, a pele é colhida e a “força de ruptura” da incisão é determinada usando um tensiômetro. Este aparelho estende a pele a uma taxa definida e mede a tensão na qual a incisão é rompida (GREENHALGH, 2005; IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016). Devido à área limitada da ferida, esse método não é o mais adequado para avaliações histológicas e bioquímicas (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010). Enquanto os modelos excisionais (FIGURA 2b) envolvem a remoção cirúrgica da epiderme e parte da derme ou as camadas dérmicas inteiras, utilizando *punch*, tesoura ou bisturi. A taxa de fechamento da ferida é determinada por meio da medida da área da lesão ao longo do tempo. Ao contrário do modelo incisional, podem ser colhidas amostras do local da excisão para análise dos tecidos, obtenção de células, RNA e exsudados, permitindo a investigação da reepitelização, formação e tecido de granulação, angiogênese, deposição de colágeno e avaliações bioquímicas

(GREENHALGH, 2005; IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016; PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010).

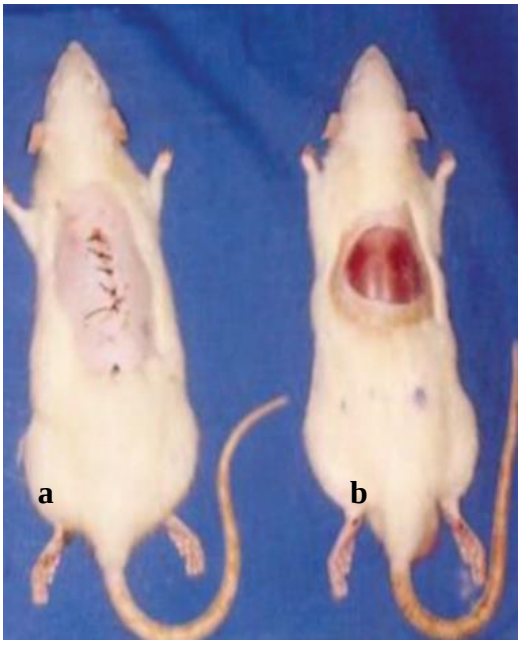

Figura 2 – Modelos de feridas incisional (a) e excisional (b).
Fonte: Shetty et al. (2006).

Os modelos de queimaduras produzem feridas por meio da indução de lesões térmicas ou químicas. As primeiras são mais utilizadas, sendo produzidas utilizando um objeto aquecido, chama ou escaldando a pele. A espessura das queimaduras é dependente do tempo de contato e da temperatura utilizada. É importante criar uma profundidade que seja o mais reprodutível possível e o método da chama é o mais inadequado para isso (IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016). Dependendo da profundidade da lesão, esse modelo permite medir os mesmos parâmetros citados para as feridas excisionais. É bastante utilizado para testar agentes que impedem a progressão de lesões por queimadura (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010).

Grande variedade de espécies têm sido utilizadas em estudos de cicatrização de feridas, como peixes zebra, axolotes, camundongos, ratos, cobaias, coelhos, cães, gatos, porcos, ovelhas e cavalos (LINDBLAD, 2008; PEREZ; DAVIS, 2008). A maioria dos estudos são realizados com roedores e porcos (IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016). Esses últimos possuem a pele anatomicamente mais parecida com a humana, além de apresentarem respostas físicas e moleculares semelhantes a vários fatores de crescimento. Ao contrário de roedores e outros animais, a pele dos porcos está firmemente presa ao subcutâneo, como nos humanos. Infelizmente, os suínos têm uma desvantagem significativa de custo em relação a animais menores. Enquanto os modelos com pequenos roedores são baratos, de fácil obtenção,

manuseio e requerem menos espaço, alimento e água. Além disso, eles geralmente têm modos de cura acelerados, reduzindo o tempo de duração do experimento. Podem ser facilmente alterados geneticamente e fornecerem um modelo de ferida capaz de se aproximar de condições humanas deficientes, como diabetes, deficiências imunológicas e obesidade (PEREZ; DAVIS, 2008).

As vantagens de viabilidade citadas acima levaram a ampla base de conhecimento científico a partir da cicatrização de feridas em murinos, que se acumulou ao longo de anos de pesquisas (DORSETT-MARTIN, 2004). Entretanto, é preciso considerar as diferenças anatômicas entre as espécies. Ao contrário dos humanos, os ratos e camundongos são descritos como animais de pele solta, ou seja, sua pele está frouxamente ligada ao subcutâneo. Além disso, eles têm o *panniculus carnosus*, que é uma fina camada de músculo esquelético localizado entre a gordura subcutânea e a derme. Essa camada muscular permite movimentos da pele independentes das camadas musculares mais profundas e é responsável pela rápida contração da pele após as lesões. Como resultado, os roedores curam feridas excisionais mais por contração do que pela reepitelização e formação de tecido de granulação, enquanto que o oposto ocorre em humanos (BOYKO; LONGAKER; YANG, 2017; DORSETT-MARTIN, 2004). Outras diferenças, com menor importância, são a densa presença de pelos na pele murina e a ausência de glândulas apócrinas e écrinas (DORSETT-MARTIN, 2004). Essas diferenças não impedem o uso dos modelos murinos, mas os resultados devem ser contrastados com a cicatrização de feridas em humanos (LINDBLAD, 2008). Uma abordagem para "humanizar" a ferida murina é suturar as suas bordas a um anel de silicone, forçando a ferida a cicatrizar principalmente por reepitelização (GALIANO et al., 2004).

As diferenças anatômicas e funcionais entre os sexos dos animais também são fatores que podem interferir nos resultados. Por exemplo, a derme de ratos machos é consideravelmente mais espessa e resistente, com maior teor de colágeno, enquanto nas fêmeas a epiderme e hipoderme são mais espessas, devido a maior proliferação celular (IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016). Muitos pesquisadores optam por trabalhar com animais machos a fim de evitar as variações hormonais presentes nas fêmeas (DORSETT-MARTIN, 2004). A idade também influencia os resultados: estudos com ratos de diferentes linhagens observaram que o fechamento de feridas, a reepitelização e a granulação sofrem atraso ou diminuição em animais mais velhos. Assim, muitos estudos utilizam ratos adultos jovens **(**KIM; MUSTOE; CLARK, 2015).

Em levantamento realizado sobre experimentos de modelos de cicatrização em ratos, Dorsett-Martin (2004) verificou que as linhagens mais utilizadas foram Sprague Dawley e

Wistar, predominando animais machos e adultos. Quanto aos tipos de indução das feridas, 38,2% dos estudos usaram modelos excisionais, 38,2% usaram modelos incisionais e alguns usaram combinação de ambos. A maioria dos estudos (78,2%) utilizou o dorso como local da ferida. O tamanho das feridas excisionais circulares variou de 6 a 20 mm de diâmetro e o das incisionais de 5 mm a 8 cm de comprimento. Os autores relataram ainda a falta de consenso sobre o tamanho das feridas. Alguns trabalhos recomendam o uso de feridas quadradas com no mínimo 4 cm^2 para permitir o estudo dos efeitos da contração e reepitelização; outros consideram que feridas grandes em relação ao tamanho da superfície corporal podem gerar estresse físico e metabólico.

Durante o experimento, os animais devem ser mantidos em gaiolas individuais, em ciclo claro escuro 12/12 hs, temperatura ambiente controlada, água e ração *ad libitum.* É adequado período de 7 a 10 dias para aclimatação dos animais no laboratório antes do início do procedimento experimental (MASSAHUD-JÚNIOR; SALOMÉ, 2016).

O planejamento experimental envolve a definição dos grupos experimentais, dos intervalos de tempo para a avaliação e dos parâmetros a serem avaliados. De forma usual, os animais são randomizados em grupos para controle negativo (salina ou nenhum tratamento), controle positivo (medicamento de referência) e tratamento (extrato vegetal a ser testado) (BORGES, 2000). Muitas vezes o extrato vegetal é veiculado em uma forma farmacêutica, como cremes, pomadas e géis. Nesse caso, torna-se necessário um grupo para o controle do efeito do veículo, o qual é tratado com a forma farmacêutica base, sem adição de substâncias ativas. Os tratamentos são aplicados topicamente sobre as feridas, em geral uma vez ao dia. A duração do experimento e os intervalos de avaliação devem contemplar todas as fases do processo de cicatrização. A maioria dos experimentos tem duração de até 21 dias, com intervalos de tempo para avaliação dos parâmetros a cada 2, 5 ou 7 dias (GARROS et al, 2006; LUO et al., 2018; NILANI et al, 2011; PANG et al., 2017). Estudos com 28 dias de duração são adequados para observar o processo de cicatrização até a fase de remodelação dos tecidos (NASIRI et al., 2015; ZONARI et al., 2015).

Quanto aos parâmetros considerados, podem ser feitas avaliações macroscópica, histológica, bioquímica, de marcadores de cicatrização, geralmente em combinação com análises de respostas celulares e imunológicas, além de medições biomecânicas da resistência dos tecidos (DORSETT-MARTIN, 2004). Dentre as avaliações mais frequentes estão a medida da área e/ou taxa de fechamento da lesão e avaliação histológica para observação de fatores como reepitelização, formação de tecido de granulação, angiogênese e deposição de colágeno (KIM, MUSTOE, CLARK; 2015).

Para a medida da área da lesão o método mais utilizado é o registro fotográfico e determinação por planimetria digital com softwares para análise de imagem (GREENHALGH, 2005). A partir das áreas iniciais e finais das lesões, podem ser calculados parâmetros como a porcentagem da área da ferida em relação à área inicial (ZONARI et al., 2015) e o índice de cicatrização da úlcera (CAETANO et al., 2009).

A avaliação histológica permite a análise dos tecidos das feridas, em geral coletados após a eutanásia dos animais. Parâmetros frequentemente avaliados são reepitelização, proliferação vascular, infiltrado inflamatório, proliferação fibroblástica, colagenização dentre outros. Podem ser usados corantes gerais, como a hematoxilina e eosina e também corantes específicos para determinados tecidos, como o Tricrômico de Masson, que evidencia em azul o tecido conjuntivo (GARROS et al., 2006; ZONARI et al., 2015). Também podem ser realizados métodos imuno-histoquímicos, com análise dos níveis de hidroxiprolina, fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e anticorpos, dentre outros (LUO et al., 2018; PANG et al., 2017).

4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS AUXILIARES À CICATRIZAÇÃO

Sabe-se que a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) gerada a partir do dano tecidual resulta em citotoxicidade e retardo na cicatrização de feridas (SHETTY; UDUPA; UDUPA, 2008). Assim, compostos com ação antioxidante reduzem os danos dos tecidos por contribuírem para a neutralização das ERO, abundantes no local da ferida e que em excesso prejudicam a cicatrização (PITZ, 2018; VALIZADEH et al., 2015). Portanto, supõe-se que a identificação de compostos bioativos que apresentem, além da ação cicatrizante, propriedades antioxidantes, é relevante para o processo de cura das lesões (NASIRI et al., 2015).

Uma das técnicas utilizadas consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de coloração púrpura, que absorve a 517 nm. Por ação de um antioxidante em meio aquoso, o DPPH• é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente mudança da absorção. O monitoramento do decréscimo da absorvância após a reação fornece a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres (MOLYNEUX, 2004).

De forma semelhante, outro método que envolve a captura de espécies radicalares é o que emprega o ácido 2,2’-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS). Ocorre a partir da adição de persulfato de potássio, que leva à formação de ABTS•+ e cor verde no meio reacional. Na presença de antioxidantes, ocorre a redução à ABTS e mudança da coloração, o

que acarreta em decréscimo na absorvância entre 600-750 nm. Apresenta a vantagem de ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis (SUCUPIRA et al., 2012).

O ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação do β-caroteno induzida por produtos da peroxidação de um ácido graxo (como o ácido linoleico) também possibilita avaliar o efeito antioxidante de produtos naturais. Os compostos radicalares produzidos reagem com as duplas ligações do β-caroteno, o que resultaria em descoloração da cor alaranjada característica e mudança da absorção a 470 nm (LIMA, 2008).

Ainda no contexto antioxidante, o método de capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) verifica a capacidade sequestradora de um composto frente a formação de radicais peroxila induzidos pelo 2,2'-azobis(2-amidinopropano)dihidrocloreto (AAPH) (GONÇALVES, 2008). Os radicais peroxila diminuem a fluorescência da ficoeritrina e da fluoresceína. O antioxidante adicionado reage rapidamente com os radicais, doando átomos de hidrogênio e inibindo a perda da intensidade da fluorescência. Essa inibição é proporcional à atividade antioxidante (WU et al., 2004). Uma vantagem do uso do método ORAC com relação aos demais métodos antioxidantes que usam a absorvância, é o uso da fluorescência como medida do dano oxidativo, havendo menor interferência dos compostos coloridos presentes nas amostras (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

No contexto do reparo tecidual, a ocorrência de infecções é outro fator relevante, que pode levar ao retardo da cura de lesões. Contagens bacterianas superiores a 10^5 microrganismos/g de tecido e/ou presença de estreptococo beta-hemolítico impedem a cicatrização de feridas, mesmo quando submetidas a suturas primárias, enxertos ou retalhos (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). Portanto, é relevante pesquisar a atividade antimicrobiana dos produtos naturais com potencial cicatrizante.

A literatura acerca dos métodos microbiológicos aplicáveis aos produtos naturais é vasta e possibilita estabelecer a menor concentração da amostra-teste capaz de inibir o crescimento microbiano (JORGENSEN; FERRARO, 2009). Masson (2011) avaliou simultaneamente a atividade antimicrobiana e o potencial cicatrizante em úlceras cutâneas infectadas do óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*. O mesmo apresentou atividade cicatrizante, potencializada pela atividade antimicrobiana observada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Rezaei e colaboradores (2015) estudaram a atividade antibacteriana do extrato hidroetanólico de *Althaea officinalis* L. e seu efeito na cicatrização em modelo de feridas induzidas em ratos. O extrato foi capaz de atuar como antibiótico contra bactérias gram-positivas e acelerou o processo de cicatrização das feridas.

5 FORMULAÇÕES

Além das determinações apresentadas, especial atenção deve ser dada ao veículo e/ou formulação empregados nos ensaios de cicatrização, pois pode haver interferência nos resultados obtidos, aumentando ou diminuindo os efeitos dos produtos testados. Características físico-químicas, como viscosidade, hidrofilicidade ou lipofilicidade, influem no tempo de permanência da forma farmacêutica sobre a lesão, na liberação das substâncias ativas e na permeação cutânea (IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016).

Embora sejam necessários estudos específicos para cada formulação, de forma geral, quanto maior a viscosidade, maior é a aderência sobre a pele. Além disso, formas farmacêuticas de natureza predominantemente aquosa são mais facilmente lavadas pelos exsudatos e fluidos presentes na ferida, permanecendo menos tempo sobre a mesma. A maior ou menor afinidade das bases pelos compostos ativos nelas veiculados, resulta em menor ou maior liberação das substâncias ativas para a pele, respectivamente. Por exemplo, formas farmacêuticas de natureza lipofílica, como as pomadas oleosas, tendem a reter os compostos lipofílicos (como os terpenos) e liberar os compostos hidrofílicos (como os polifenóis). O oposto pode acontecer com formas farmacêuticas de natureza hidrofílica, como os géis aquosos. Esses fatores devem ser avaliados ao escolher a forma farmacêutica na qual os produtos naturais com potencial cicatrizante serão veiculados para os experimentos (LOURENÇO, 2013).

Neste contexto, variadas formas farmacêuticas podem ser destinadas ao tratamento de feridas, desde os agentes tradicionais como gazes e formulações tópicas convencionais (pomadas, cremes, géis, soluções e suspensões), até os curativos modernos na forma de filmes, hidrogéis, hidrocolóides e espumas (COSTA et al., 2020). As formas farmacêuticas tópicas tradicionais estão disponíveis como preparações líquidas (soluções e suspensões) ou semissólidas (pomadas, géis e cremes). Estas mantêm o leito da ferida úmido e permitem a veiculação de agentes farmacológicos que participam ativamente do processo de cicatrização, como por exemplo, antimicrobianos, enzimas e anti-inflamatórios. A principal desvantagem para uso experimental está relacionada ao tempo reduzido de permanência na superfície da ferida, pois absorvem os fluidos locais e são lavadas, sendo necessário a reaplicação (MANDELBAUM; SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Contudo as coberturas modernas, como os curativos constituídos por filmes, hidrogéis hidrocolóides e espumas, atuam como barreira física às sujidades e agentes infecciosos, mantendo o ambiente limpo, além de poderem veicular compostos bioativos. Promovem a manutenção da umidade no local, permitem trocas gasosas, isolamento térmico, absorvem o

excesso de secreções, reduzindo a degradação dos tecidos, dor, odor, auxiliando na reconstrução da pele. Também permanecem por mais tempo sobre as feridas, diminuindo a frequência de troca dos curativos (BOATENG et al., 2008; HARDING; MORRIS; PATEL, 2002; MICKELSON; MANS; COLOPY, 2016).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial de utilização dos produtos naturais para o reparo de tecidos e cicatrização de feridas vem sendo amplamente demonstrado por meio de númerosos estudos, sendo relacionado a diferentes classes de compostos bioativos. O trabalho de pesquisa envolve várias etapas, desde a caracterização química da espécie, passando pela avaliação de suas atividades biológicas e pela determinação da forma farmacêutica mais adequada para veicular os compostos bioativos. Há variados modelos experimentais disponíveis, desde os computacionais, até *in vitro* e *in vivo*; cada um deles trazendo um nível de respostas sobre o processo de reparo dos tecidos. Ao selecioná-los, devem ser considerados fatores como os objetivos do estudo e a infraestrutura disponível. Modelos *in vitro* são capazes de avaliar, com relativa rapidez e simplicidade, aspectos mais específicos, como a resposta de um ou dois tipos celulares aos extratos testados. Modelos animais são mais eficientes para reproduzir as condições biológicas e eventos envolvidos na cicatrização, porém demandam mais tempo para sua realização e envolvem maior complexidade. Assim, a pesquisa de produtos naturais para a cicatrização de feridas é um campo promissor, que envolve diferentes áreas do conhecimento, sendo necessário uma equipe multidisciplinar para alcançar uma abordagem exitosa.

7 REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório**: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. Disponível em: < https://static.scielo.org/scielobooks/sfwtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf>. Acesso em: 23 jun. de 2020.

BATISTA, S. et al. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 1, p. 136-141, 2012.

BOATENG, J. S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.

BORGES, E. L. **Tratamento de feridas: avaliação de um protocolo.** 2000. 164 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

BOYKO, T. V.; LONGAKER, M. T.; YANG, G. P. Laboratory models for the study of normal and pathologic wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 139, n. 3, p. 654-662, 2017.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo - patologia geral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 364 p.

CAETANO, K. S. et al. Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 27, n. 1, p. 111-118, 2009.

CAGNI, T. F.; LUBI, N. *Aloe vera* no reparo tecidual. **Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde**, Curitiba, n. 20, p. 33-42, 2018.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

COSTA, N. N. et al. Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: *in vitro* analysis and physicochemical evaluation. **Materials Science and Engineering: C**, Lausanne, v. 109, p. 110643, 2020.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

D'ACAMPORA, A. J. et al. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, Florianópolis, v. 36, n. 1, p. 69-75, 2007.

DINIZ, L. R. L. **Efeito das saponinas triterpênicas isoladas de raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* ducke sobre a função renal.** 2006. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas- Fisiologia e Farmacologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

DORSETT-MARTIN, W. A. Rat models of skin wound healing: a review. **Wound Repair and Regeneration**, Saint Louis, v. 12, n. 6, p. 591-599, 2004.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Evaluation of the antioxidant activity using the b-carotene/linoleic acid system and the DPPH scavenging method. **Food Science and Technology**, London, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substancias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC/UFRGS, 2003. p. 108-122.

FERRERO, D. **Fitoterapia**: conceitos clínicos. São Paulo: Atheneu, 2006.

GALIANO, R. D. et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, Saint Louis, v. 12, n. 4, p. 485-492, 2004.

GARROS, I. D. C. et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 55-65, 2006.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GOUGH, W. et al. A quantitative, facile, and high-throughput image-based cell migration method is a robust alternative to the scratch assay. **Journal of Biomolecular Screening**, Thousand Oaks, v. 16, n. 2, p. 155-163, 2011.

GREENHALGH, D. G. Models of wound healing. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, Saint Louis, v. 26, n. 4, p. 293-305, 2005.

HANANEH, W. M.; ISMAIL, Z. B.; ALSHEHABAT, M. A. Review of animal models used to study effects of bee products on wound healing: findings and applications. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, Pulawy, v. 59, p. 425-431, 2015.

HARDING, K. G.; MORRIS, H. L.; PATEL, G. K. Healing chronic wounds. **British Medical Journal**, London, v. 324, n. 7330, p. 160-163, 2002.

HEINZMANN, B. M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia:** do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 167-184.

IGNACIO, G.; EL-AMIN, I.; MENDENHALL, V. Animal models for wound healing. In: ALBANNA, M. Z.; HOLMES IV, J. H. **Skin tissue engineering and regenerative medicine**. New York: Academic Press/Elsevier, 2016. p. 387-400.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 49, n. 11, p. 1749-55, 2009.

KANZAKI, T. et al. Role of transforming growth factor-β pathway in the mechanism of wound healing by saponin from *Ginseng* Radix rubra. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 125, n. 2, p. 255-262, 1998.

KIM, D. J.; MUSTOE, T.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing in aging small mammals: a systematic review. **Wound Repair and Regeneration**, Saint Louis, v. 23, n. 3, p. 318-339, 2015.

KUMAR, V. et al. **Robbins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb**.). 2008. 219 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LINDBLAD, W. J. Considerations for selecting the correct animal model for dermal wound-healing studies. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, Utrecht, v. 19, n. 8, p. 1087-1096, 2008.

LIPTAK, J. M. An overview of the topical management of wounds. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 75, n. 6, p. 408-413, 1997.

LOURENÇO, A. R. N. **Administração tópica de fármacos: das restrições aos desafios**. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

LU, L. et al. Asiaticoside induction for cell-cycle progression, proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 43, n. 11, p. 801-807, 2004.

LUO, P. et al. *Castanea mollissima* shell prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the dermal wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 220, p. 9-15, 2018.

MAENTHAISONG, R. et al. The efficacy of *Aloe vera* used for burn wound healing: a systematic review. **Burns**, Guildford, v. 33, n. 6, p. 713-718, 2007.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P. D.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003.

MASSAHUD-JÚNIOR, M. R.; SALOMÉ, G. M. **Protocolo de cirurgia experimental de ferida cirúrgica em ratos**. Pouso Alegre: UNIVÁS, 2016. Disponível em: < http://www.univas.edu.br/mpcas/egresso/publicacao/2017021640053721962690.pdf>. Acesso em: 26 jun. de 2020.

MASSON, D. S. **Atividades cicatrizante e antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em úlceras cutâneas**. 2011. 216 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MELO, A. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia:** do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 235-248.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MICKELSON, M. A.; MANS, C.; COLOPY, S. A. Principles of wound management and wound healing in exotic pets. **Veterinary Clinics of North America**: **Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 19, n. 1, p. 33-53, 2016.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Hat Yai, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MORISAKI, N. et al. Mechanism of angiogenic effects of saponin from *Ginseng* Radix rubra in human umbilical vein endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 115, p. 1188-1193, 1995.

MOUTASIM, K. A.; NYSTROM, M. L.; THOMAS, G. J. Cell migration and invasion assays. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 731, p. 333-334, 2011.

NASIRI, E. et al. Effect of *Malva sylvestris* cream on burn injury and wounds in rats. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, Mashhad-Iran, v. 5, n. 4, p. 341-354, 2015.

NIEHUES, E. et al. Caracterização reológica da mucilagem de *Cereus hildmaniannus*. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 4201-4207, 2015.

NILANI, P. et al. Formulation and evaluation of wound healing dermal patch. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Lagos, v. 5, n. 9, p. 1252-1257, 2011.

OLIVEIRA, A. F. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. Ferrea) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 302-310, 2010.

PANG, Y. et al. Effects and mechanisms of total flavonoids from *Blumea balsamifera* (L.) DC. on skin wound in rats. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 12, p. 2766, 2017.

PEPLOW, P. V.; CHUNG, T.; BAXTER, G. D. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 28, n. 3, p. 291-325, 2010.

PEREZ, R.; DAVIS, S. C. Relevance of animal models for wound healing. **Wounds: a Compendium of Clinical Research and Practice**, Florida, v. 20, n. 1, p. 3-8, 2008.

PISTORE, M. et. al. Avaliação do uso tópico do óleo essencial de *Ruta graveolens* l. (arruda) na cicatrização de feridas em ratos. **Perspectiva**, Erechim, v. 38, n. 141, p. 57-68, 2014.

PITZ, H. S. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos de cascas de jabuticaba (*Plinia peruviana*) e sua atuação durante o processo de cicatrização**. 2018. 165 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

REZAEI, M. et al. Evaluation of the antibacterial activity of the *Althaea officinalis* L. leaf extract and its wound healing potency in the rat model of excision wound creation. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, Mashhad, v. 5, n. 2, p. 105-112, 2015.

SHETTY, B. et al. Effect of *Centella asiatica* L (Umbelliferae) on normal and dexamethasone-suppressed wound healing in Wistar albino rats. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, New York, v. 5, n. 3, p. 137-143, 2006.

SHETTY, S.; UDUPA, S.; UDUPA, L. Evaluation of antioxidant and wound healing effects of alcoholic and aqueous extract of *Ocimum sanctum* Linn in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 5, n. 1. p. 95-101, 2008.

SHUKLA, A. et al. *In vitro* and *in vivo* wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. J. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 65, p. 1-11, 1999.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, Londrina, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.

THAKUR, R. et al. Practices in wound healing studies of plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 2011, p. 1-17, 2011.

TODARO, G. J.; LAZAR, G. K.; GREEN, H. The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, Philadelphia, v. 66, p. 325-333, 1965.

UD-DIN, S.; BAYAT, A. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: *in silico*, *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* models of wounds and scars in human skin. **Wound Repair and Regeneration**, Saint Louis, v. 25, n. 2, p. 164-176, 2017.

VALIZADEH, R. et al. Wound healing potential of *Althaea officinalis* flower mucilage in rabbit full thickness wounds. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Hainan, v. 5, n. 11, p. 937-943, 2015.

VIEIRA, A. P. et al. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 65-74, 2008.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

WU, X. et al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 12, p. 4026-4037, 2004.

ZANATTA, C. F. et al. Photoprotective potential of emulsions formulated with buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. **Food and Chemical Tóxicology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 70-75, 2010.

ZONARI, A. et al. Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate structures loaded with adipose stem cells promote skin healing with reduced scarring. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 17, p. 170-181, 2015.

Técnicas *in vitro* e *in vivo* utilizadas para avaliar o efeito de produtos naturais no controle de carrapatos

Gabriela Rocha de Assunção[1]
Vanderson de Ataide Paulucio[2]
Barbara Rauta de Avelar[3]
Erika Takagi Nunes[4]
Adilson Vidal Costa[5]
Vagner Tebaldi de Queiroz[6]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: gabrielarochaassuncao@gmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vandersonpaulucio.zoo@gmail.com
[3] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e-mail: barbararauta@gmail.com
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: erikatnunes@gmail.com
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: avcosta@hotmail.com
[6] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vagnertq@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos, parasitos hematófagos de animais domésticos como cães e gatos e também de animais de produção, como os bovinos, são reconhecidos em todo o mundo por causarem diversos problemas, como transmissão de doenças, redução de produtividade e grandes perdas econômicas (NOGUEIRA et al., 2020; PÉREZ DE LEÓN; MITCHELL; WATSON, 2020). As espécies de maior relevância veterinária pertencem a família Ixodidae, envolvendo os gêneros *Ixodes, Dermacentor, Amblyomma, Haemophysalis, Hyalomma e Rhipicephalus.* Muitas espécies desses gêneros, também possuem relevância inclusive para a saúde pública, pois podem atuar na transmissão de zoonoses. No Brasil destacam-se os gêneros *Amblyomma* e as espécies *Rhipicephalus sanguineus, Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens* (PÉREZ DE LEÓN; MITCHELL; WATSON, 2020).

O controle de carrapatos, especialmente do gênero *Rhipicephalus*, tem encontrado barreiras frente ao desenvolvimento de resistência aos principais produtos químicos utilizados em todo o mundo (ARAFA et al., 2020; KLAFKE et al., 2017; SHAKYA et al., 2020; VILLAR et al., 2020), demonstrando a necessidade do desenvolvimento de tecnologias alternativas que visem diminuir os problemas causados pela infestação por carrapatos (PÉREZ DE LEÓN; MITCHELL; WATSON, 2020).

Atualmente, o interesse do meio científico e público em tratamentos à base de produtos naturais em todo o mundo é cada vez maior, o que tem atraído a atenção até mesmo de indústrias farmacêuticas, incentivando o investimento nesta área de pesquisa (POLITI et al., 2015). Assim, bioensaios vêm sendo usados para avaliar produtos de origem natural com potencial acaricida e contribuir no desenvolvimento de alternativas que auxiliem no controle de carrapatos (BANUMATHI et al., 2017; BEYS-DA-SILVA et al., 2020; CASTRO et al., 2018; JIA et al., 2018; LIMA et al., 2018).

No presente capítulo, estão descritos protocolos de bioensaios para a avaliação do efeito de produtos naturais no controle de carrapatos bem como algumas variações utilizadas para estes protocolos.

2 PREPARO DAS AMOSTRAS CONTENDO PRODUTOS NATURAIS

A triagem inicial para a escolha do solubilizante e a caracterização química dos produtos naturais constituem as etapas que antecedem a realização dos testes para avaliar o efeito dos produtos naturais no controle dos carrapatos. Na etapa de triagem, o solubilizante deve ser

avaliado tendo em vista a porcentagem de letalidade sobre o organismo alvo, bem como a solubilização do produto a ser testado. Na composição das formulações testadas, os agentes solubilizantes devem atuar como excipientes, cuja letalidade não seja superior a 10% (FAO, 2004).

Acetona (FERREIRA et al., 2019), metanol, etanol, éter lauril sulfato, Tween 80® e dimetilsulfóxido (DMSO) encontram-se entre os agentes solubilizantes comumente utilizados. Queiroz et al. (2020), avaliaram a atividade de formulações contendo 1,8-cineol ou citral ou eugenol (1,0%) ou óleo de mamona (0,3%) dissolvido em 2,0% de DMSO + 0,2% de Tween 80® sobre *R. microplus*. O etanol e metanol também têm sido considerados como agentes solubilizantes apropriados para dissolver extratos vegetais em testes acaricidas (ADENUBI et al., 2016). O etanol foi utilizado por Novato et al. (2018) na avaliação da atividade acaricida de timol, carvacrol e seus derivados acetilados.

A etapa de caracterização química dos produtos naturais é de extrema importância antes da avaliação dos efeitos dos produtos naturais sobre carrapatos. Os óleos essenciais extraídos de diferentes partes da planta ou da mesma parte da planta quando coletada em diferentes condições edafoclimáticas podem apresentar variação em sua composição química (PETROVIĆ et al., 2018). Nos casos em que os óleos essenciais apresentem variação em seus componentes e teores, provavelmente, serão observados efeitos diferentes sobre a atividade biológica (ROSADO-AGUILAR et al., 2017).

Dentre os métodos utilizados para a caracterização química dos óleos essenciais encontram-se a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) ou a um detector de ionização em chama (CG/DIC) (COSTA et al., 2015; JIA et al., 2018; LIMA et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2020; QUEIROZ et al., 2020). Outro método utilizado é a ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (CERCEAU et al., 2016; DELNAVAZI et al., 2017; NOVATO et al., 2018), método que pode ser utilizado para verificar adulteração em óleos essenciais de origem comercial (CERCEAU et al., 2020).

3 TESTES *IN VITRO*

Os testes *in vitro*, aceitos e publicados no meio científico em todo o mundo (ARAFA et al., 2020; KONIG et al., 2019; SHAKYA et al., 2020), são estudos controlados realizados em laboratório seguindo protocolos padronizados. Permitem sua reprodução por outros pesquisadores, sendo alternativas importantes para estudos iniciais e testes de novas formulações de produtos, como novos acaricidas alternativos (NOVATO et al., 2018). No caso

de testes de carrapaticidas, possibilitam a utilização de métodos sem o uso direto em animais, como bovinos, representando menor custo, menor tempo e menor variabilidade (CERQUEIRA, 2008).

No entanto, nenhum teste é perfeito em todas as circunstâncias (FAO, 2004), estudos *in vitro* possuem limitações, pois, na natureza, o ambiente não é controlado e está sujeito a interferência de diversos fatores. Entretanto, tais experimentos são importantes para estudos iniciais no sentido de direcionar e refinar os futuros testes *in vivo*.

3.1 TESTE DE PACOTE DE LARVAS

O teste de pacote de larvas ("*Larval packet test"* – LPT) é o teste padrão recomendado pela FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura) na avaliação da resistência de populações de carrapatos a acaricidas, sendo também amplamente utilizado em estudos que avaliam o efeito de diversos ativos sobre carrapatos. Esse método mostra-se vantajoso pela facilidade no transporte das larvas e ovos e manutenção desses, por certo tempo, em laboratório, porém é um método limitado pelo tempo que demanda, necessitando de 5 a 6 semanas para ser concluído (FAO, 2004).

Este método foi desenvolvido por Stone e Haydock, em 1962, sendo ainda atualmente utilizado por autores como, por exemplo, Novato et al. (2018) e Shakya et al. (2020), com algumas modificações feitas ao longo dos anos.

Para este teste, originalmente utiliza-se papel filtro nas dimensões de 850 mm x 750 mm impregnado com 670 µL de uma solução contendo a substância a ser testada diluída em uma parte de azeite extra virgem diluída para duas de tricloroetileno. Após a secagem e evaporação do tricloroetileno do papel filtro, que varia de 2 a 24 horas dependendo do grupo de pesquisa (CASTRO-JANER et al., 2009; RECK et al., 2014), o papel filtro é dobrado e fechado com clipes em cada lado, formando um pacote onde as larvas são acondicionadas. Após período de 24 horas do fechamento do pacote, verifica-se a mortalidade das larvas expostas a concentrações da substância testada, sendo consideradas vivas aquelas que apresentam movimento, mesmo que mínimo.

O controle negativo do ensaio deve ser realizado com o diluente utilizado para diluir a substância teste, diluente estes que variam entre produtos naturais sejam eles óleos essenciais ou extratos, como descrito no último tópico deste capítulo. Em ensaios *in vitro* de acordo com a FAO (2004) quando a mortalidade é superior a 10% no grupo controle, os resultados devem ser desconsiderados pois existem erros na execução da técnica. Mortalidades de 0 a 10% no

controle são consideradas normais em testes com carrapatos, entre 5 e 10% deve-se utilizar a fórmula descrita por Abbott (1925) a partir do número de vivos na testemunha (T) e no tratamento (Tr), descrita a seguir para a mortalidade corrigida:

$$E\ \% = (T - Tr) / T \times 100$$

Já para percentuais de mortalidades até 5% pode utilizar apenas a fórmula de mortalidade descrita por Chagas et al. (2002):

Mortalidade (%): larvas mortas x 100 / larvas totais.

Monteiro et al. (2012) aplicaram esse teste, com modificações, para verificarem a atividade acaricida de eugenol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus*. As dimensões de papel filtro utilizado foram de 6 x 6 cm para o pacote, contendo aproximadamente 100 larvas, impregnado com 90 µL da solução a ser testada e dez repetições para cada grupo. Cada grupo foi mantido em câmara climatizada a 27° C, com umidade de cerca de 80%, sendo a mortalidade contabilizada após 24h. Já Novato et al. (2018), ao avaliarem a atividade acaricida dos compostos carvacrol, timol e eugenol, através do LPT modificado por Monteiro et al. (2012), utilizaram cerca de 50 larvas em cada grupo, provavelmente pela dificuldade de manuseio e contagem das mesmas, que são muito ativas, havendo necessidade de habilidade para colocá-las dentro do pacote de papel filtro.

3.2 TESTE DE IMERSÃO LARVAL

O teste de imersão larval (*"Larval Imersion Test"* – LIT) é um ensaio que também utiliza larvas de carrapato. Descrita como a técnica mais sensível para testes de resistência acaricida frente a moléculas como lactonas macrocíclica e fipronil por Castro-Janer et al. (2009) e Sabatini et al. (2001), porém não tão amplamente utilizado como LPT, para ensaios com produto naturais. Whitehead (1958) foi um dos primeiros pesquisadores que utilizou o método de imersão das larvas, posteriormente, refinado por Shaw (1966).

Na metodologia de Shaw (1966), utiliza-se entre 300 a 500 larvas de *Rhipicephalus microplus* com 14 a 21 dias. Estas são distribuídas sobre papel filtro em placa de Petri, onde são imersas por 10 minutos em solução na concentração avaliada; após esse tempo, a solução é drenada, as larvas secas com papel filtro e com auxílio de pincel, aproximadamente 100 larvas

serão colocadas dentro de pacote de papel filtro para avaliação da mortalidade após 24 ou 48 horas (CRUZ et al., 2016).

Avelar et al. (2016), em estudo da atividade *in vitro* de óleos essenciais e extratos de *Schinus molle* L., realizaram o teste de imersão larval proposto por Shaw (1966), mas com adaptações: foram utilizadas larvas de 7 - 10 dias de idade; cada grupo de larvas foi imerso, por 30 segundos em soluções variando as concentrações entre 20.000 e 1.250 ppm, sendo em seguida feita a leitura da mortalidade das larvas. Dentre os resultados do estudo, o extrato hexânico de *S. molle* apresentou maior atividade *in vitro*, com eficácia de 57,7% na concentração de 1.250 ppm.

Ferreira et al. (2019) também utilizaram LIT com adaptações, propostas por Leite (1988) e Chagas et al. (2002). Para cada concentração de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* utilizada no estudo (40 a 0.0781 $mg.mL^{-1}$), aproximadamente 100 larvas de cada espécie de carrapato (*A. sculptum, R. sanguineus* e *R. microplus*) não alimentadas e com 21 dias de idade foram depositadas em um "sanduíche" de papel filtro (2 cm x 2 cm), impregnado com 0,5 mL da solução teste. O "sanduíche" de papel filtro foi fechado em envelope de papel de filtro (6 cm x 6 cm) devidamente selado com clipes e mantidos em uma câmara climatizada por 24 h para posterior leitura e cálculo da mortalidade, feita como no LPT.

Na literatura indexada disponível, outros autores que trabalham com produtos naturais também utilizam a técnica do sanduíche de papel filtro, descrita acima no trabalho de Ferreira et al. (2019) adaptada da técnica proposta por Leite (1988) e Chagas et al. (2002). No entanto, esses autores classificam essa técnica como LPT, e não como LIT. Essa divergência de nomenclatura observada deve-se ao fato de que, quando se trata de produtos naturais, não existe um guia sobre os ensaios, assim como existe a FAO (2004) para os ensaios de resistência com acaricidas convencionais, ficando a cargo de cada grupo de pesquisa a padronização dos ensaios realizados.

Exemplos de trabalhos observados com a metodologia de sanduíche, descrita como LPT são: Cruz et al. (2016) com extrato metanólico de *Acmella oleracea* frente a *R. microplus* e *D. nitens*, Monteiro et al. (2017) com óleo essencial de *Cinnamomum verum* e Figueiredo et al. (2018) com óleo essencial de *Ocotea elegans*, ambos avaliando atividade das substâncias frente a *R. microplus*.

3.3 TESTE DE REPELÊNCIA LARVAL

Teste de repelência larval ("*Larval repellent test"* - RT) é um dos métodos que podem ser aplicados no estudo por alternativas aos produtos químicos convencionais, auxiliando a busca de novas formulações para o controle de carrapatos, como extratos vegetais e óleos essenciais com potencial repelente (NOGUEIRA et al., 2020). Neste método desenvolvido por Chagas e Rabelo (2012), utiliza-se palitos de madeira impregnados de bioativos com potencial atividade repelente, aproximadamente 100 larvas, as quais são colocadas na base do palito e iniciam dispersão para cima no palito ou para as extremidades do papel.

Apesar de ser um método relativamente simples, poucos trabalhos publicados utilizaram esta técnica, tendo Figueiredo et al. (2018), utilizado palito de madeira mergulhado, durante 6 horas, em soluções do óleo essencial de *Ocotea elegans* nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,78 mg/mL, para estimar seu efeito repelente. Após imersão, cada palito foi fixado no centro de um copo de plástico descartável onde aproximadamente 100 larvas foram adicionadas a base do palito. Elas se moveram em direção ao palito ou foram dispersas na área ao redor deste. As larvas de cada área foram quantificadas com uma bomba de vácuo, estimando a repelência de *O. elegans.*

Nogueira et al. (2020), utilizaram esse mesmo método descrito por Figueiredo et al. (2018), mas para avaliação do efeito repelente do óleo essencial e nanoemulsão de *Pilocarpus spicatus*, mas nas concentrações de 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 25 e 50 mg/mL.

3.4 TESTE DE IMERSÃO DE ADULTAS

Apesar do teste padrão recomendado pela FAO (2004) para caracterização de resistência ser o LPT, o teste de imersão de adultas (*Adult Imersion Test* – AIT), tem sido adotado com sucesso em diversos laboratórios (KUMAR; SHARMA; GHOSH, 2020).

O AIT é realizado com fêmeas ingurgitadas (teleóginas) e há muitos anos tem sido utilizado para determinar a eficácia relativa de acaricidas contra carrapatos. A metodologia foi descrita por Drummond et al. (1973), como segue: após a coleta, as fêmeas ingurgitadas passam por uma lavagem e são separadas em grupos homogêneos de 10 indivíduos. Em seguida, os grupos são pesados e imersos, por 30 segundos, nas soluções a serem testadas sendo, logo após, colocados em papel filtro para secar e então acondicionados em frascos de vidro identificados. Os frascos são mantidos a temperatura de 27 ºC, com umidade relativa de cerca de 80%, por 2 semanas. Após esse primeiro momento, as fêmeas são descartadas e então os ovos resultantes

da postura desses indivíduos são pesados, devolvidos aos frascos e a eclosão dos ovos estimada visualmente. Para verificar a atividade da solução testada é então calculado o índice de eficiência reprodutiva (IER) e eficácia (EC) através das seguintes fórmulas:

(IER) = peso dos ovos/peso das fêmeas x 20.000 x % eclodibilidade

EC = (IER controle - IER tratamento)/IER controle x 100.

O número 20.000, presente na fórmula do índice de eficiência reprodutiva, representa uma constante referente ao números de ovos de carrapato encontrado em um grama de postura.

Em estudos recentes, a metodologia de AIT vem sendo utilizada com poucas modificações. Jia et al. (2018), na tentativa de desenvolver alternativa a resistência e resíduos causados pelos acaricidas químicos convencionais, avaliou o efeito do óleo essencial da planta *Arisaema anurans* e de seus componentes majoritários sobre indivíduos da espécie *R. microplus* utilizando AIT. Dentre as poucas alterações no método, as fêmeas coletadas foram imersas por 5 minutos, tempo esse descrito, na maioria dos testes com produtos de origens naturais. Em relação aos resultados, a maior porcentagem de redução de oviposição foi de 44,2%, 51,0% de redução de eclosão e 73,2% percentual de eficácia, revelando que o óleo de *Arisaema anurans* e seus componentes majoritários são alternativas potenciais aos acaricidas sintéticos convencionais.

Castro et al. (2018), em estudo sobre a atividade de óleos essenciais de três espécies de plantas das famílias Lamiaceae e Zingiberaceae, bem como Santos et al. (2018), em estudo sobre o efeito do extrato das folhas de *Digitaria insularis* sobre *R. microplus*, também utilizaram a metodologia AIT com tempo de imersão das fêmeas de 5 minutos, porém com 18 dias de incubação dos ovos. Em contrapartida, Figueiredo et al. (2018), em estudo que avaliou o efeito acaricida de *Ocotea elegans*, planta da família Lauraceae, em indivíduos da mesma espécie, incubou os ovos por 15 dias, apesar de mesmo tempo de imersão. Estas variações no tempo de incubação prejudica a comparação entre os estudos. Além disso, o controle da temperatura e umidade de incubação também podem interferir diretamente sobre a eclodibilidade dos ovos, demonstrando a necessidade de padronização nos procedimentos adotados no AIT para avaliar o efeito biológico de produtos naturais. As condições de incubação para a manutenção do ciclo do carrapato recomendadas pela FAO (2004) são: temperatura entre 27 e 28 ºC e 85 a 95% de umidade relativa.

4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MORFOLÓGICOS

4.1 HISTOLOGIA

Para o desenvolvimento de novos produtos, inclusive de produtos naturais, é preciso investigar o modo de ação e os efeitos deste sobre o alvo. A avaliação histológica contribui nesse sentido, pois evidencia alterações teciduais nas estruturas que compõem o organismo animal e que podem impedir o sucesso adaptativo ou a sobrevivência do animal (ASSUNÇÃO et al., 2019).

Politi et al. (2015), ao avaliarem a ação da solução de extrato etanólico de *Tagetes patula* sobre a eclodibilidade e embriogênese de *Rhipicephalus sanguineus*, submeteram fêmeas ingurgitadas ao teste de imersão, com exposição durante 5 minutos em solução de 70% do extrato etanólico 50 mg/mL. A seguir, estas foram mantidas em BOD, a 28 °C e 80% de umidade, durante 5 dias, e então dissecadas para a retirada dos ovários que foram fixados em paraformaldeído a 4% por 24 h. Este material foi então desidratado em série de etanol, embebidos em resina (Polysciences ®) durante 24 horas a 4 °C, seccionado e as lâminas obtidas foram avaliadas. Foram descritas alterações morfológicas significativas na conformação externa dos ovos, como a diluição da cera de revestimento que é importante na embriogênese e eclodibilidade das larvas, protegendo-as contra a desidratação. Os autores verificaram que a imersão durante 5 minutos nas soluções de ensaio, fez com que os ovos ficassem susceptíveis a trocas osmóticas, demonstrando o potencial do extrato testado para controle do parasito.

Recentemente, Konig et al. (2020), em estudo dos ovários de fêmeas de mesma espécie expostas a acetilcarvacrol, utilizaram técnica semelhante de Politi et al. (2015). As principais alterações foram que após exposição a solução, também durante 5 minutos, os ovários das fêmeas de carrapatos foram dissecados e fixados em glutaraldeído a 4% por 72 horas, sendo as demais etapas semelhantes as já descritas. Nos grupos tratados, os carrapatos foram expostos a concentrações diferentes de acetilcarvacrol (10,0, 12,5, 15,0, 17,5, 20,0, 22,5 e 25,0 $\mu L\ mL^{-1}$), diluídas em solução de DMSO a 3%. O carvacrol, componente majoritário de diversos óleos essenciais extraídos de vegetais, foi então associado aos danos causados as estruturas analisadas, evidenciando seu potencial como alternativa no controle de carrapatos. Dentre as alterações observadas, pode-se citar: o desaparecimento e diminuição no tamanho de oócitos, vacuolização do nucléolo e córion mais espesso, onde o grupo exposto à acetilcarvacrol 20 µL/mL, apresentou danos mais severos comparado aos demais.

Ao avaliar as alterações morfológicas em glândulas salivares e singânglios de carrapatos expostos ao timol, monoterpeno encontrado em óleos essenciais de plantas das famílias Lamiaceae, Verbenaceae e Apiaceae, Matos et al. (2019) verificaram que este componente tem potencial acaricida sobre fêmeas de *R. sanguineus.* Na técnica utilizada, os carrapatos foram expostos as soluções por 5 dias, sendo em seguida dissecados e fixados em paraformaldeído a 4% e desidratados em séries crescentes de etanol em intervalos de 15 minutos. A infiltração foi em resina Leica, e após a polimerização dos blocos, secções de 3 µm, em lâminas de vidro, foram coradas por HE e analisadas sob microscopia de luz. Os carrapatos expostos ao timol apresentaram danos tanto nas células dos singânglios como naquelas das glândulas salivares, sendo observados núcleos picnóticos ou fragmentados, além do citoplasma extremamente vacuolizado, demonstrando o potencial acaricida do timol em fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus.*

Em estudo com a mesma espécie, Souza et al. (2019), com o objetivo de avaliar a ação de diferentes concentrações (20, 50 e 100 µL/mL) de carvacrol na morfofisiologia dos ovários, utilizaram 20 carrapatos de cada grupo que fora submetido ao teste de imersão de adulto proposto por Drummond et al. (1973). Após serem imersas por 5 minutos e secas com papel filtro, as fêmeas foram acondicionadas em placas de Petri e incubadas por 7 dias em BOD (27 ºC e umidade relativa de 80%). Após choque térmico, em congelador a 2 °C por 1 minuto, com intuito de diminuir o metabolismo sem causar a morte, as fêmeas foram dissecadas para remoção dos ovários. A fixação das amostras foi feita em paraformaldeído 4% por 7 dias, e a desidratação em série de etanol (70, 80, 90 e 95%) com intervalos de 20 minutos. Após demais etapas da rotina histológica, as lâminas foram analisadas, sendo detectadas alterações mais significativas nos indivíduos submetidos a maior concentração de carvacrol (100 µL/mL), cujo os oócitos não puderam se desenvolver além do estágio II, demonstrando que o tratamento com esse monoterpeno pode dificultar a geração de novos indivíduos, o que resultaria em controle de longo prazo.

4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A análise do efeito de diversos compostos sobre tecidos de carrapatos tem se mostrado uma ferramenta essencial na identificação de compostos com potencial acaricida que auxiliem no controle deste parasito (ASSUNÇÃO et al., 2019). Neste sentido, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET) permitem o estudo da forma e estrutura fina de carrapatos para detecção de possíveis alterações teciduais decorrentes

da ação de diferentes compostos (ABDEL-SHAFY; EL NAMAKY; KHALIL, 2011; ITURBE-REQUENA et al., 2020; MOREIRA et al., 2018), entretanto, estas ferramentas foram pouco empregadas nos estudos que envolvem compostos naturais potencialmente acaricida.

Remedio et al. (2015) observaram a interferência do óleo extraído das sementes de neem (*Azadirachta indica*) na reprodução de carrapatos da espécie *R. sanguineus*, através de MET. No experimento, as soluções de óleo de neem nas concentrações de 20% (TI), 40% (TII) e 60% (TIII) foram aplicadas via tópica, com auxílio de escova, em carrapatos fixados no dorso de coelhos, duas vezes por dia, durante três dias. As aplicações de aproximadamente 5 mL de solução começaram 24 horas após a fixação do carrapato no hospedeiro. Os grupos controle receberam aplicações de água destilada e água + 10% de etanol. No quarto dia de infestação, as fêmeas semi-ingurgitadas foram coletadas e dissecadas para retirada dos ovários. Neste trabalho, as amostras foram submetidas, sequencialmente, ao protocolo de MET: fixação em glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7.2), por 72 h; lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (15 min, por duas vezes); e pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO_4), por 2 h; lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (15 min, por duas vezes); imersão em solução aquosa a 10% de etanol por 15 min; contrastação, no escuro, em acetato de uranila a 1%; desidratação em uma série crescente de acetona (50, 70, 90 e 100%, por 5 minutos em cada solução; inclusão em resina e obtenção dos cortes ultrafinos; contrastação em acetato de uranila e citrato de chumbo e observação sob MET. Efeitos mais expressivos foram observados na morfologia dos ovócitos dos indivíduos do grupo TIII, com núcleos apresentando irregularidade na membrana, além de muitas regiões de desorganização e intensa vacuolização citoplasmática.

O mesmo protocolo foi utilizado por Remedio et al. (2016), no estudo de glândulas salivares permitindo observação de alterações nas estruturas acinares, sendo os efeitos dose-dependente. Os danos observados nestes trabalhos com carrapatos expostos ao óleo de neem, mostraram que o o óleo de *A. indica* pode causar prejuízos no comportamento alimentar e no desenvolvimento reprodutivo dos parasitos, sendo assim, substância potencial para o controle de *R. sanguineus*.

Sampieri et al. (2013), ao avaliar o efeito em fêmeas de *R. sanguineus* expostas a óleo de mamona (*Ricinus communis*), utilizaram mesmo protocolo de MET. No bioensaio, ésteres de ácido ricinoléico sintetizados a partir do óleo de mamona (concentrações de 2 e 5 gramas de ésteres/kg de alimento) e incorporado em NaCl, foram adicionados a ração de coelhos. Esses foram alimentados por 7 dias e, depois, infestados com 30 fêmeas de carrapato. As fêmeas, com quatro dias completos de alimentação (semi-ingurgitamento), foram coletadas e tiveram os

ovários dissecados e processados para MET. O grupo tratado com 5 g de ésteres/kg de alimento apresentaram as alterações mais graves principalmente em oócitos maduros, afetando sua viabilidade, sendo os ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona considerados promissores no controle de *R. sanguineus.*

5 TESTES *IN VIVO*

Os testes clínicos *in vivo* são realizados a fim de avaliar o desempenho do acaricida quando utilizado no hospedeiro no campo, e para fornecer informações a cerca da toxidez e segurança do produto quando sob condições diversas. Porém, atualmente, a maioria dos estudos realizados é feita em laboratório com ambiente controlado (ROSADO-AGUILAR et al., 2017), sendo escassos trabalhos realizados a campo, frente às barreiras impostas pela influência de fatores ambientais nos resultados. Assim, não há padronização nos procedimentos para estudos *in vivo* dos efeitos acaricidas de óleos essenciais, extratos de plantas e seus derivados.

Segundo Rosado-Aguilar et al. (2017), de 1998 a 2016, dentre os principais componentes derivados de plantas conhecidos com potencial acaricida, apenas timol, carvacrol e 1,8-cineol foram testados em condições *in vivo*.

Valente et al. (2017), avaliaram a eficácia de formulação “pour on” a 5% de eugenol, extraído da espécie de planta *Eugenia caryophyllata* conhecida como cravo-da-índia. Nesse estudo foram utilizados bezerros criados em galpões telados e semanalmente banhados com produtos piretróides para impedir infestação por carrapatos, sendo os banhos suspensos 30 dias antes do experimento. Dez bezerros, sem prévio contato com carrapatos, foram infestados com aproximadamente 1500 larvas de *R. microplus*, com 14 dias após a eclosão, e tratados com a formulação, na dose de 10 mL para cada 100 kg de peso vivo, em aplicação única no 21º dia após a infestação artificial. A eliminação de *R. microplus* e o efeito residual da formulação foi avaliada por meio de contagens diárias de todas as fêmeas, maiores ou iguais a 4,5 mm de comprimento, presentes no lado esquerdo de cada bovino. Os resultados do estudo mostraram que a formulação de eugenol na concentração de 5% “pour on” demonstrou baixa eficácia em fêmeas adultas e não afetou a reprodução desse ixodídeo.

Mais recentemente, Marques et al. (2019), basearam seus estudos nas recomendações da Portaria nº 48 de 12 de maio de 1997 (BRASIL MAPA, 1997), que trata de teste a campo de produtos acaricidas, para avaliar a atividade do butóxido de piperonil (PBO), obtido por reação de síntese laboratorial a partir do safrol, constituinte majoritário do óleo de cânfora em populações de carrapatos da espécie *R. microplus*, associado ou não a siloxanos organo-

modificados. Foram selecionados bovinos que continham no mínimo 40 carrapatos fêmeas com tamanhos de 4,5 mm a 8,00 mm de cada lado do animal e separados em grupos experimentais, com 10 animais em cada grupo. O dia da aplicação do tratamento foi designado como dia zero, onde foi realizada pulverização manual com cinco litros do produto diluído (2,5%) direcionado contra os pelos dos animais em todo o corpo. No dia sete, cada bovino foi examinado para remover e contar os carrapatos. A eficácia foi determinada através da seguinte fórmula:

$$[1-(Ta \times Cb) + (Tb \times Ca)] \times 100, \text{ onde:}$$

Ta = número médio de teleóginas recuperadas dos animais tratados, após a medicação; Tb = número médio de teleóginas recuperadas dos animais tratados nos 3 dias anteriores ao tratamento; Ca = número médio de teleóginas recuperadas dos animais controle no período pós tratamento; Cb = número médio de teleóginas recuperadas dos animais controles nos 3 dias anteriores ao dia do tratamento.

Os resultados mostraram alta atividade acaricida (98,75%) para formulação contendo siloxanos organo-modificados a 2,5% + PBO a 10%.

6 CONCLUSÕES

Através das técnicas apresentadas é possível avaliar a eficiência de produtos de origem natural, a fim de selecionar aqueles que apresentem características promissoras para um acaricida como boa eficiência acaricida, em baixas concentrações letais, baixo custo de obtenção e alto rendimento, servindo como alternativa aos acaricidas convencionais ou utilizados em associações com estes para driblar a resistência, fornecendo novas opções para o controle dos carrapatos.

7 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo auxílio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

8 REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. The value of the dry substitutes for liquid lime. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 18, p. 265–267, 1925.

ABDEL-SHAFY, S.; EL NAMAKY, A. H.; KHALIL, F. H. M. Scanning electron microscopy and morphometrics of nymph and larva of the tick *Hyalomma impressum* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, n. 6, p. 1509–1518, 2011.

ADENUBI, O. T. et al. Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: a review. **South African Journal of Botany**, KwaZulu-Natal, v. 105, p. 178–193, 2016.

ARAFA, W. M. et al. Detection of single nucleotide polymorphism in the para-sodium channel gene of *Rhipicephalus annulatus* populations from Egypt resistant to deltamethrin. **Ticks and Tick-borne Diseases**, Lippersdorf, v. 11, n. 5, p. 101488, 2020.

ASSUNÇÃO, G. R. de. et. al. Ação de compostos naturais e sintéticos sobre tecidos de carrapatos do gênero *Rhipicephalus*. In: TRIVILIN, L. O.; CARDOSO, L. D.; SILVA, M. A. da. **Tópicos especiais em ciência animal VIII**. Alegre: CAUFES, 2019. p. 298-316.

AVELAR, B. R. de. et al. *In vitro* activity of essential oils and extracts from *Schinus molle* L. against *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 183–187, 2016.

BANUMATHI, B. et al. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* – A review. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 244, p. 102–110, 2017.

BEYS-DA-SILVA, W. O. et al. Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, New York , v. 208, n. August 2019, p. 1–9, 2020.

BRASIL MAPA. **Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário**. Portaria n. 48, 16 de maio 1997. Disponível em: <http:// www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/ produtos-veterinarios/legislacao-1/portaria/portaria-sda-mapa-no-48-de-12-05- 1997>. Acesso em: 18 de jul. 2020.

CASTRO-JANER, E. et al. *In vitro* tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162, n. 1–2, p. 120–128, 2009.

CASTRO, K. N. C. et al. *In vitro* efficacy of essential oils with different concentrations of 1,8-cineole against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 203–210, 2018.

CERCEAU, C. I. et al. A validated 1H NMR method for quantitative analysis of α-bisabolol in essential oils of *Eremanthus erythropappus*. **Talanta**, London, v. 161, p. 71–79, 2016.

CERCEAU, C. I. et al. 1H-NMR and GC for detection of adulteration in commercial essential oils of *Cymbopogon* ssp. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 31, n. 1, p. 88–97, 2020.

CERQUEIRA, N. Métodos alternativos ainda são poucos e não substituem totalmente o uso de animais. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 47–49, 2008.

CHAGAS, A. C. de S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 39, n. 5, p. 247–253, 2002.

CHAGAS, A. C. de S.; RABELO, M. D. **Método para detecção de substâncias com atividade repelente sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*:** revisão e recomendações. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2012.

COSTA, A. V. et al. Chemical composition of essential oil from *Eucalyptus citriodora* leaves and insecticidal activity against *Myzus persicae* and *Frankliniella schultzei*. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, Pune, v. 18, n. 2, p. 374–381, 2015.

CRUZ, P. B. et al. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 228, p. 137–143, 2016.

DELNAVAZI, M. R. et al. Isolation of phenolic derivatives and essential oil analysis of *Prangos ferulacea* (L.) lindl. aerial parts. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Teerã, v. 16, p. 207–215, 2017.

DRUMMOND, R. O. et al. Tests of acaricides for control of *Boophilus annulatus* and *B. microplus*. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 69, n. 1, p. 37–40, 1973.

FAO. **Resistance management and integrated parasite control in ruminants – guidelines, module 1 – Ticks: acaricide resistance: diagnosis, management and prevention**. Rome: Food and Agriculture Organization Animal Production and Health Division, 2004.

FERREIRA, T. P. et al. *In vitro* acaricidal activity of *Ocimum gratissimum* essential oil on *Rhipicephalus sanguineus*, A*mblyomma sculptum* and *Rhipicephalus microplus* larvae. **Revista Virtual de Quimica**, São Paulo, v. 11, n. 5, p. 1604–1613, 2019.

FIGUEIREDO, A. et al. First report of the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 252, n. December 2017, p. 131–136, 2018.

ITURBE-REQUENA, S. L. et al. Oogenesis and embryogenesis inhibition induced by two new ethyl-carbamates in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, Lippersdorf, v. 11, n. 2, p. 101326, 2020.

JIA, M. et al. Chemical composition and acaricidal activity of *Arisaema anurans* essential oil and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 261, p. 59–66, 2018.

KLAFKE, G. et al. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus*

microplus from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, Lippersdorf, v. 8, n. 1, p. 73–80, 2017.

KONIG, I. F. M. et al. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol strongly impact oocyte development of engorged female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, Lippersdorf, v. 10, n. 4, p. 766–774, 2019.

KONIG, I. F. M. et al. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, Oxford, v. 129, p. 102780, 2020.

KUMAR, R.; SHARMA, A. K.; GHOSH, S. Menace of acaricide resistance in cattle tick, *Rhipicephalus microplus* in India: status and possible mitigation strategies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 278, p. 108993, 2020.

LEITE, R. C. ***Boophilus microplus* (Canestrini, 1887):** susceptibilidade, uso atual e restropectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiogeograficas da baixada do Grande–Rio e do Rio de Janeiro, uma abordagem epidemiológica. 1988. 176 f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) – Programa de Pós Graduação em Ciências da Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1988.

LIMA, A. S. et al. Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 117, n. 1, p. 59–65, 2018.

MARQUES, C. B. et al. *In vitro* and *in vivo* acaricidal activity evaluation of organo-modified siloxanes in populations of *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 269, n. 5, p. 53–56, 2019.

MATOS, R. S. et al. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, Lippersdorf, v. 10, n. 2, p. 314–320, 2019.

MONTEIRO, C. M. de. et al. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 3, p. 1295–1300, 2012.

MONTEIRO, I. N. et al. Chemical composition and acaricide activity of an essential oil from a rare chemotype of *Cinnamomum verum* Presl on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 238, p. 54–57, 2017.

MOREIRA, L. H. et al. Effect of ozone as acaricide: action of the ozone on the cuticle and respiratory spiracle of tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. **Ozone: Science and Engineering**, Cincinnati, v. 40, n. 3, p. 183–190, 2018.

NOGUEIRA, J. A. P. et al. Repellency effect of *Pilocarpus spicatus* A. St.-Hil essential oil and nanoemulsion against *Rhipicephalus microplus* larvae. **Experimental Parasitology**, New York , v. 215, p. 107919, 2020.

NOVATO, T. et al. *In vitro* assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 260, n. July, p. 1–4, 2018.

PÉREZ DE LEÓN, A. A.; MITCHELL, R. D.; WATSON, D. W. Ectoparasites of cattle. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 36, n. 1, p. 173–185, 2020.

PETROVIĆ, G. et al. Essential oil analysis of different plant parts of *Geocaryum cynapioides* (Guss.) L . Engstrand. **Biologica Nyssana**, Niš, v. 9, n. 1, p. 31–35, 2018.

POLITI, F. A. S. et al. Action of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) on hatchability and embryogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* eggs (Acari: Ixodidae). **Industrial Crops and Products**, St Martin d'Heres, v. 67, n. 55–61. p. 1–25, 2015.

QUEIROZ, V. T. de. et al. 1,8-cineole and castor oil in sodium lauryl ether sulphate disrupt reproduction and ovarian tissue of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, 2020.

RECK, J. et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 201, n. 1–2, p. 128–136, 2014.

REMEDIO, R. N. et al. Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 114, n. 2, p. 431–444, 2015.

REMEDIO, R. N. et al. Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration. **Micron**, Oxford, v. 83, p. 19–31, 2016.

ROSADO-AGUILAR, J. A. et al. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 238, n. 6, p. 66–76, 2017.

SABATINI, G. A. et al. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam v. 95, n. 1, p. 53–62, 2001.

SAMPIERI, B. R. et al. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to castor oil (*Ricinus communis*): an ultrastructural overview. **Parasitology Research**, Berlin, v. 112, n. 2, p. 611–619, 2013.

SANTOS, F. O. et al. *In vitro* acaricide and anticholinesterase activities of digitaria insularis (Poaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 255, p. 102–106, 2018.

SHAKYA, M. et al. Emergence of fipronil resistant *Rhipicephalus microplus* populations in Indian states. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 80, n. 4, p. 591–602, 2020.

SHAW, R. D. Culture of an organophosphorus resistance, strain of *B. microplus* and an assessment of its spectrum. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 56, n. L 2400, p. 389–405, 1966.

SOUZA, J. R. L. de. et al. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, Oxford, v. 116, p. 66–72, 2019.

STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 53, n. 3, p. 563–578, 1962.

VALENTE, P. P. et al. *In vivo* efficacy of a biotherapic and eugenol formulation against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 116, n. 3, p. 929–938, 2017.

VILLAR, D. et al. Resistance profile and molecular characterization of pyrethroid resistance in a *Rhipicephalus microplus* strain from Colombia. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 105–115, 2020.

WHITEHEAD, G. B. Acaricide resistance in the blue tick, *Boophilus decoloratus* (Koch).–part I. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 49, n. 4, p. 661–673, 1958.

Técnicas de filtragem utilizadas na aquicultura

Layon Carvalho de Assis[1]
Joyce Garcia Silva[2]
Leonardo Demier Cardoso[3]
João Victor Nascimento Tardim[4]
Venan Vieira dos Anjos[5]
Paola de Oliveira Santos[6]
Silvia Pope de Araujo[7]
Alberto Chambela Neto[8]
Pedro Pierro Mendonça[9]

[1] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: layoncdeassis@gmail.com
[2] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: joyce_g_silva@hotmail.com
[3] Instituto Federal do Espirito Santo, e-mail: leonardodemier@hotmail.com
[4] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: jvntardim@gmail.com
[5] Instituto Federal do Espírito Santo: e-mail: vieira.venan@gmail.com
[6] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: paolamanfredini111@gmail.com
[7] Universidade Federal do Rio de Janeiro, e-mail: silviapopedearaujo@gmail.com
[8] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: chambela@ifes.edu.br
[9] Instituto Federal do Espírito Santo: e-mail: ppierrom@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Apesar da grande evolução dos empreendimentos aquícolas, o setor é extremamente dependente de recursos naturais como a água. No mundo, a pressão pelo uso sustentável desse recurso aumenta dia após dia, exigindo que a aquicultura moderna trabalhe no desenvolvimento de sistemas mais eficientes e compactos (LIMA; KEBUS, 2008).

Não apenas o racionamento de recursos naturais impulsionam o desenvolvimento de novas tecnologias, mas também a profissionalização da atividade aquícola, na busca incessante por melhores resultados zootécnicos e financeiros. A qualidade da água de cultivo sempre teve destaque por exercer forte influência sobre estes resultados, o que é exacerbado pelo aumento de densidade e compactação das áreas de produção. Para atingir o crescimento precoce e ciclos mais rápidos e rentáveis, são necessárias rações altamente proteicas em quantidades adequadas à idade e espécie cultivada, porém, altas taxas alimentares geram resíduos que afetam a dinâmica dos parâmetros físicos, químicos e biológicos da água, trazendo efeitos indesejáveis aos animais. Prover qualidade ambiental aos animais de cultivo é básico para que se obtenha desempenho zootécnico adequado (LIMA; KEBUS, 2008).

A grande maioria dos resíduos existentes na água de aquicultura são de origem orgânica, e a decomposição desses compostos além de formarem metabólitos tóxicos aos animais, aumentam consideravelmente a demanda bioquímica por oxigênio dissolvido (HELDBO, 2015). Estima-se que quanto mais tempo esses compostos permanecerem na água, maiores serão os gastos necessários em filtragem biológica, bombeamento de água e aeração, além da necessidade de limpezas mais frequentes e proliferação de organismos patogênicos (KUBITZA, 2006).

Objetivando melhorar a qualidade de água dos cultivos, assim como reduzir o nível de efluente descartado, os sistemas de filtragem passam por inovações e desenvolvimento, porém muitas vezes as metodologias são usadas de forma errônea. Segundo Kubitza (2006), o insucesso operacional e econômico em sistemas de aquicultura está intimamente ligado ao incorreto dimensionamento de estruturas de filtragem, tentativas de operação com componentes inadequados e desconhecimento sobre o funcionamento básico do sistema.

Portanto, informações sobre o funcionamento e dimensionamento de sistemas de filtragem são essenciais para produtores iniciantes e experientes, podendo contribuir com detalhes por vezes negligenciados, com potencial para alavancar a qualidade e viabilidade do cultivo.

2 FILTRAÇÃO MECÂNICA

A filtração mecânica tem como objetivo a remoção de partículas sólidas presentes na água. Em sua grande maioria, essas partículas originam-se de sobras de alimento e resíduos fecais dos organismos aquáticos. Estima-se que 20 a 30% do peso da ração fornecida irá se tornar sólido na água, o que limita a capacidade de suporte do sistema, visto que estes sólidos quando suspensos causam lesões branquiais, além de aumentar significativamente a demanda por oxigênio dissolvido (LIMA; KEBUS, 2008)

Segundo Kubitza (2006), os resíduos sólidos podem ser classificados de acordo com seu tamanho e flutuabilidade em: 1) Sólidos decantáveis - partículas maiores que 100 micra; 2) Sólidos em suspensão – partículas entre 100 e 40 micra; 3) Sólidos finos / dissolvidos partículas menores que 40 micra.

Os três métodos primários de remoção destes sólidos são sedimentação, filtragem e flotação. A mecânica difere entre os métodos, que funcionam, cada qual, mais eficientemente para determinada classe de sólido (HELDBO, 2015). Metade dos sólidos geralmente são decantáveis e podem ser removidos através de tanques ou cones de decantação, 25% dos sólidos encontram-se em suspensão, o que demanda a utilização de telas, filtros de areia ou outra mídia filtrante, e os demais 25%, por estarem dissolvidos acabam necessitando de sistemas de flotação para serem removidos (KUBITZA, 2006)

2.1 SEDIMENTAÇÃO

A decantação, é o modelo mais simples de remoção de sólidos usado na aquicultura, no qual os modelos mais tradicionais baseiam-se simplesmente em proporcionar a passagem lenta da água por um tanque, permitindo que as partículas sedimentem (FIGURA 1) (YAMAMOTO, 2017).

Apesar de simples, esse processo precisa ser dimensionado, para que a velocidade do fluxo de água não comprometa a decantação. Ao se dividir a vazão do efluente a ser tratado (m^3/h) pela área superficial do tanque de decantação (m^2) chega-se a uma velocidade (m/h), que não pode ser superior à velocidade que o material suspenso leva para decantar. Como esse material é composto basicamente por fezes e sobras de ração, consideram-se a densidade desses elementos durante o cálculo. Indica-se a proporção de $1m^2$ de tanque de decantação para 1,7 m^3/h de efluente (SCOTT, 1991).

Outro fator considerado é a velocidade que o efluente atravessa o tanque de decantação. Esse fator deve ser considerado para evitar que a turbulência causada pela passagem do efluente suspenda as partículas sedimentadas. Para esse cálculo considera-se a razão entre a velocidade do efluente em relação à área transversal do tanque, recomendando-se 1m² de área transversal para cada 240 m³ de efluente (SCOTT, 1991).

Baseado em seus cálculos, então, Scott (1991) sugere que o dimensionamento de um tanque de decantação seja realizado com base em:

Comprimento = 1.21 x √ Vazão (m³/h)

Largura = 0,49 x √ Vazão (m³/h)

Profundidade = 0,017 x √ Vazão (m³/h)

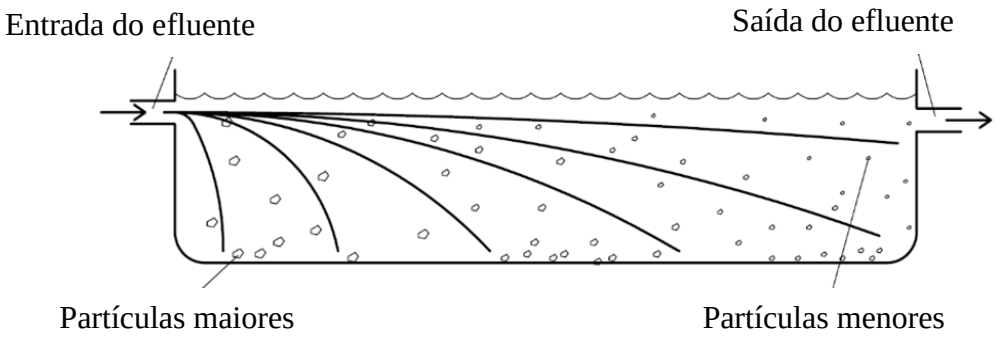

Figura 1 – Tanque de decantação com sedimentos de diferentes tamanhos e densidades sedimentando ao longo do tanque.
Fonte: Adaptado de Lekang (2013).

Em sistemas fechados, como ocorre na recirculação de água, utiliza-se decantadores cônicos (FIGURA 2), que diferentemente dos tanques de decantação anteriores, promove a sedimentação com o fluxo de água em maior velocidade. Neste modelo, a água é forçada a girar dentro da estrutura, formando um ciclone, e toma o encanamento de saída na região central do cone. O princípio utilizado é que a força centrífuga acentua a diferença gravitacional imposta pela maior densidade dos sólidos em relação à água, fazendo com que estas partículas sejam lançadas em direção à parede da estrutura e cheguem até o fundo cônico, de onde podem ser expurgas (LEKANG, 2013).

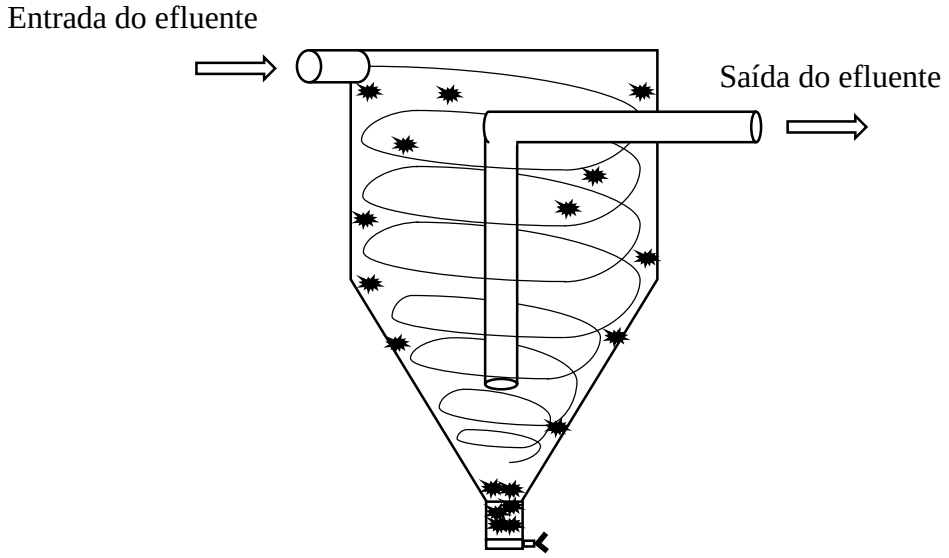

Figura 2 – Esquema de decantador de fundo cônico em funcionamento.
Fonte: Os autores.

2.2 FILTRAGEM

Esse tipo de filtragem consiste na utilização de telas, malhas plásticas, chapas perfuradas ou tecido, com o intuito de reter as maiores partículas a medida que a água passa. Os modelos estáticos, pela simplicidade e baixo custo de implantação acabam sendo muito utilizados, porém, não possuem alta eficiência na retenção de partículas finas e frequentemente tem os poros colmatados, necessitando de limpeza regular. A partir daí, desenvolveu-se modelos mais eficientes como filtros de mídias granulares (filtro de areia) e modelos auto limpantes, como o filtro de tambor rotativo (FIGURA 3) (LEKANG, 2013).

A praticidade do filtro de tambor rotativo o pôs em evidência na aquicultura mundial. A estrutura possui um conjunto de micro telas (40 a 100 micra) em formato tubular e à medida que o efluente passa pelas telas as partículas sólidas ficam retidas, colmatando aos poucos os poros da tela, dessa forma, o nível de água sobe no interior do filtro, por não conseguir fluir com facilidade através da malha. Nesse momento, um sensor detecta a elevação e aciona o motor que gira essa estrutura tubular, emergindo a região colmatada, que recebe um jato de água desobstruindo a passagem. Todo o resíduo cai na canaleta central eliminando a matéria coletada (LIMA; KEBUS, 2008).

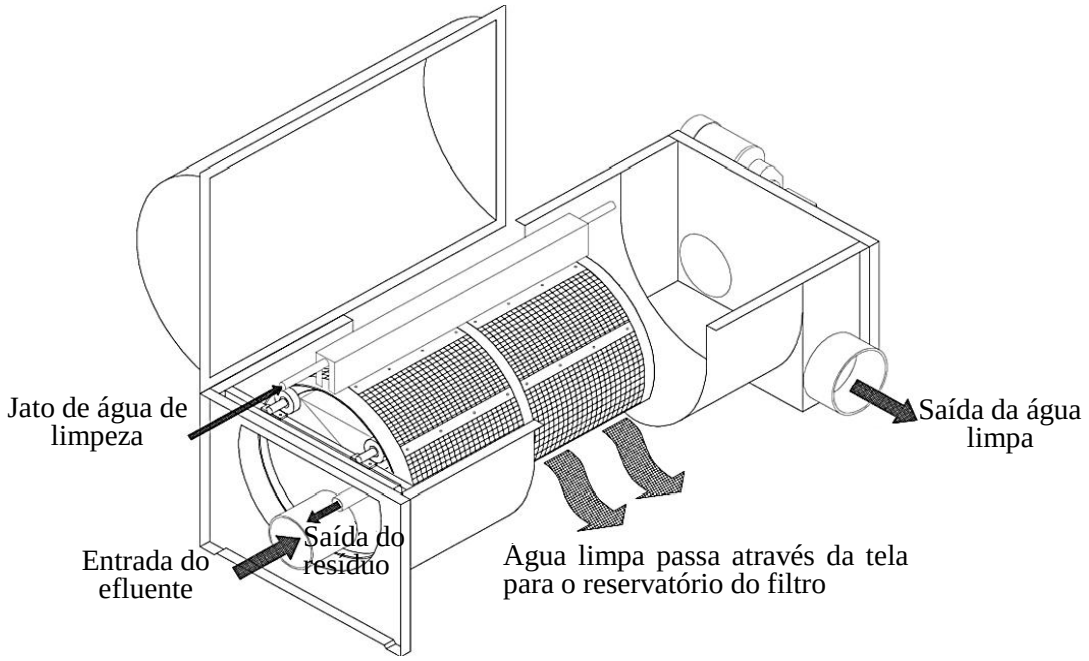

Figura 3 – Filtro de tambor rotativo
Fonte: Adaptado de Summerfelt, Bebak-Willians e Tsukuda (2015).

2.3 FLOTAÇÃO

O processo de flotação é eficiente na remoção de sólidos finos dissolvidos na água, como hidrocarbonetos, proteínas, fibras e algas com tamanho de até 30 micrômetros, portanto, não substitui a utilização de decantadores ou filtragem por telas. Como essas partículas são removidas após se fixarem em bolhas de ar, formando espuma coesa no topo do equipamento, em água doce não possui boa eficiência, sendo mais indicado em água salgada, onde a tensão superficial é maior e facilita a formação de bolhas e espuma (SUMMERFELT; BEBAK-WILLIANS; TSUKUDA, 2015; SUMMERFELT; VINCI, 2010).

O equipamento usual responsável por esse tipo de filtragem é conhecido como "p*rotein skimmer*" (FIGURA 4) e se trata de um tubo vertical, onde o efluente é lançado e recebe vigorosa aeração com microbolhas. Naturalmente, moléculas com porções hidrofóbicas são repelidas da água em direção ao ar, e é essa característica que faz o sistema funcionar. Na realidade, com a passagem das microbolhas pela água, os materiais surfactantes ou tensoativos (principalmente proteínas) são adsorvidos pela bolha, visto que a porção hidrofóbica desses materiais são "expulsos da água". Além disso, esses materiais possuem uma porção hidrofílica polar, que fica em contato com a água. Quando essa polaridade é negativa, atrai e adere substâncias com carga elétrica positiva que serão removidas do sistema juntamente, quando a polaridade é positiva, atrai as sujidades com carga negativa. Todo esse material permanece

aderido às bolhas, que se agrupam formando uma espuma flutuante forçada a sair pelo estreitamento no topo do equipamento (SUMMERFELT; VINCI, 2010).

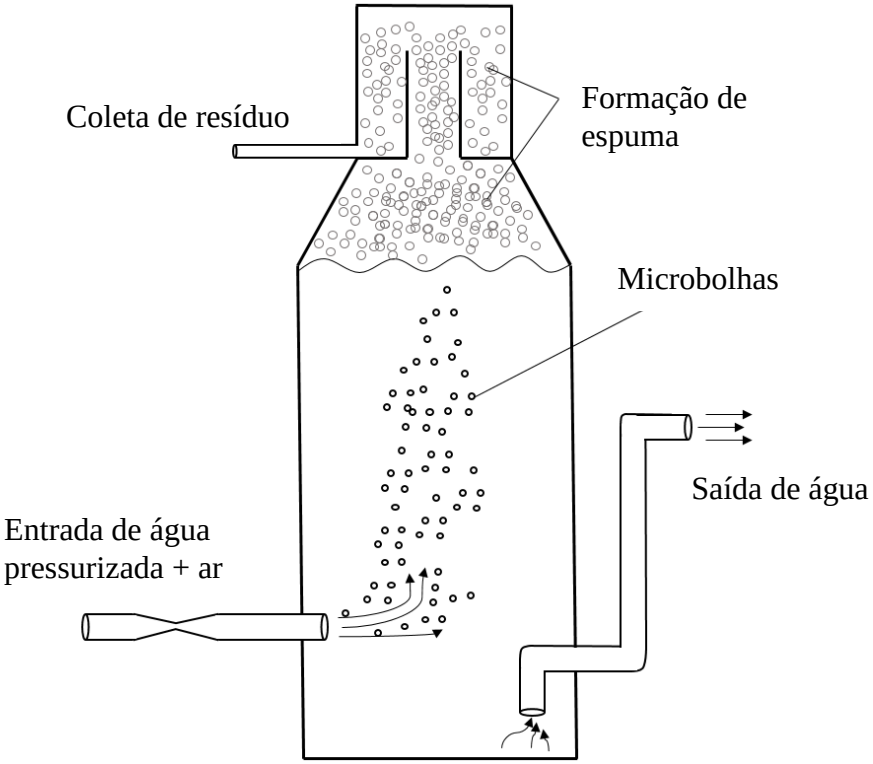

Figura 4 – Esquema de funcionamento do *Skimmer*.
Fonte: Os autores.

3 FILTRAÇÃO BIOLÓGICA

A função do filtro biológico é remover impurezas da água utilizando agentes biológicos, oxidando compostos tóxicos em compostos menos tóxicos, sobretudo os nitrogenados. O filtro é constituído de um recipiente, caixa, tanque ou cilindro repleto de substratos possibilitando a fixação das bactérias nitrificantes, responsáveis por converter amônia até nitrato (KUBITZA, 2006).

As principais fontes de amônia e compostos nitrogenados encontrados no sistema é pela excreta branquial dos organismos aquáticos, sobras de ração e ação de microrganismos na decomposição de matéria orgânica, porém, a estrutura química e grau de toxicidade em que esses compostos irão se apresentar está relacionado a processos químicos e físicos que ocorrem no meio aquático, principalmente mediados por temperatura e pH (SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

Processos metabólicos básicos dos organismos podem afetar essa dinâmica, como a respiração. O consumo de oxigênio produz gás carbônico, que ao interagir com moléculas de água forma o ácido carbônico (H_2CO_3) estimulando uma redução gradual no pH e alcalinidade total da água (KUBITZA, 2006).

De acordo com Kubitza (2006), em solução aquosa a amônia é encontrada na forma livre (NH_3) ou na forma de íon amônio NH_4^+.

Em que:

$NH_3^+ + H^+ \leftrightarrow NH_4^+$

A forma da amônia está relacionada ao valor do pH:

pH < 8 quase toda amônia está na forma de NH_4^+

pH = 9,5 em torno de 50% NH_3^+ e 50% NH_4^+

pH > 11 quase toda amônia está na forma de NH_3^+

Em pH alcalino poucos íons H^+ estão livres para reagir com a amônia, e ela se mantem não ionizada. Essa forma é altamente tóxica aos peixes, portanto a faixa usual e desejável do pH geralmente é próxima ao neutro, assim a amônia se expressa majoritariamente na forma ionizada (OLIVEIRA, 2012).

3.1 NITRIFICAÇÃO

A nitrificação ocorre com a presença de bactérias que oxidam o nitrogênio amoniacal a nitrito e posteriormente a nitrato. Os principais gêneros bacterianos responsáveis são as *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, respectivamente. Essas bactérias se desenvolvem utilizando a energia da oxidação do nitrogênio inorgânico. O processo de nitrificação ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, a presença de oxigênio e pH neutro automaticamente converte a amônia (NH_3) em amônio NH_4^+, as bactérias *Nitrosomonas* oxidam NH_4^+ em nitrito (NO_2) (etapa denominada como nitrosação). Na segunda etapa as *Nitrobacter* oxidam nitrito (NO_2) em nitrato (NO_3), essa conversão é conhecida como nitratação (KUBITZA, 2006).

De acordo com Kubitza (2006) a equação da oxidação do amônio a nitrito pelas bactérias *Nitrosomonas* é dada por:

$NH_4^+ + 1{,}5\ O_2 \rightarrow + 2\ H^+ + H_2O + NO_2^-$

E a e quação da oxidação do nitrito a nitrato pelas bactérias *Nitrobacter* é dada por:

$NO_2^- + 0{,}5\ O_2 \rightarrow NO_3^-$

As bactérias nitrificantes são sensíveis a outras formas de nitrogênio amoniacal disponíveis no sistema. A forma não ionizada ou amônia livre e ácido nitroso não ionizado

(HNO_2) inibem certas concentrações das bactérias nitrificantes. A amônia livre inibe as *Nitrossomonas* nas concentrações 10 a 150 mg/L e a *Nitrobacter* à 0,1 a 1,0 mg/L. As *Nitrosomonas* e as *Nitrobacter* são inibidas por ácido nitroso nas concentrações 0,22 a 2,8 mg/L (CALDEIRA, 2011).

Os substratos possuem diferentes formas e tipos de material que conferem determinada superfície de contato possibilitando a fixação das bactérias. Geralmente utiliza-se a relação área de superfície (m^2) / volume ocupado (m^3) como parâmetro para capacidade de eficiência da nitrificação. No qual maior área por volume possibilita a maior fixação de bactérias por volume, e ao aumentar a concentração de microorganismos possibilita-se maior contato dos elementos presentes no efluente com tais bactérias no reator, resultando em maior capacidade de tratamento na conversão do substrato (OLIVEIRA, 2012).

Como características desejáveis, o substrato deve ser de material atóxico, inerte, e a área de adesão deve ser eficiente para a fixação das bactérias. Atualmente diversos tipos de substratos são utilizados em biofiltros, como pedras, britas, areia grossa, areia fina, cascalhos, bioballs, argila expandida, flocos de isopor, concha calcária e mídias de porcelana (mini tubos redondos de material cerâmico). O fluxo de água pelo biofiltro pode ser ascendente ou descendente. No fluxo ascendente a água entra por baixo e sai por cima e no fluxo descendente a água entra por cima e sai por baixo (FONTÃO, 2017). A eficiência do biofiltro está relacionada ao dimensionamento, construção, atividade microbiana e manutenção das condições ambientais (CHEN; LING; BLANCHETON, 2006).

A nitrificação envolve os processos físicos, químicos e biológicos que são relacionados a diversos fatores como tipo de substrato, concentração de oxigênio dissolvido, salinidade, matéria orgânica, pH, alcalinidade, temperatura, e nível de turbulência (CHEN; LING; BLANCHETON, 2006).

3.2 DIMENSIONAMENTO DO BIOFILTRO

Para realizar a construção do filtro biológico é necessário estimar a quantidade de amônia produzida diariamente no sistema. Apesar de variações em decorrência da taxa de alimentação, espécie produzida, qualidade e quantidade de proteína presente na ração, segundo Somerville et al. (2014), os peixes (kg) consomem 1% do seu peso vivo por dia (kg de ração por dia), 32% da ração equivale a porcentagem de proteína, 16% é o nitrogênio presente nesta proteína, cerca de 61% desse nitrogênio é desperdiçado e cada 1 g de nitrogênio gera 1,2 g de amônia.

A equação descrita por Somerville et al. (2014) equivale a quantidade de amônia produzida no sistema:

$$\text{Ração(kg)} \times \frac{\text{32 g de proteína}}{\text{100 g de alimento}} \times \frac{\text{16 g de nitrogênio}}{\text{100 g de proteína}} \times \frac{\text{61 g de nitrogênio desperdiçado}}{\text{100 g de nitrogênio total}} \times \frac{\text{1,2 g de NH3}}{\text{1g de nitrogênio}} = \text{amônia}$$

Somerville et al. (2014) salienta que as bactérias nitrificantes removem 0,2 à 2 g de amônia por m^2/dia, recomendando para fins de cálculo 0,57 g de amônia convertida por m^2 de área de superfície por dia.

Equação para estimar a área do biofiltro (SOMERVILLE et al., 2014):

$$\text{Amônia (g)} \times \frac{1\ m^2}{0{,}57\ \text{g de amônia}} = \text{área do biofiltro (m²)}$$

A razão entre a área e o volume é a área superficial específica, dado em m^2/m^3. Um substrato comumente utilizado é a argila expandida, que possui essa relação na escala de 250 m^2 / m^3 (SOMERVILLE et al., 2014).

Equação do volume necessário de substrato (argila expandida) (SOMERVILLE et al., 2014):

$$\text{Área do biofiltro (m)}^2 \times \frac{m^3}{250\ m^2} = \text{argila expandida necessária (m}^3\text{)}$$

3.3 BIOFILME

A formação do biofilme se dá pela aderência de diversas colônias de microorganismos (bactérias, protozoários, fungos, algas) no material. Os microrganismos vão sobrepondo uns aos outros formando o biofilme (filme biológico). Para o desenvolvimento dos microrganismos preconiza-se a temperatura acima dos 13°C. O biofilme começa a se desenvolver com um fino filme de limo e após tempos de cultivo essa camada se torna mais espessa. O desenvolvimento de uma população saudável de bactérias nitrificantes pode levar até 8 semanas, e para que ocorra adesão microbiana na superfície de contato, três processos biológicos ocorrem: adsorção, adesão e aderência (OLIVEIRA, 2012).

Segundo Oliveira (2012) a formação do biofilme se compõe em 5 estágios: 1. Aderência das células bacterianas de forma reversível à superfície; 2. Produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que resulta na aderência mais firme (aderência irreversível); 3. Início do

desenvolvimento da estrutura biofilme; 4. Maturação da estrutura do biofilme; 5. Dispersão de células do biofilme.

É recomendado que as bactérias sejam cultivadas e aclimatadas antes dos peixes serem introduzidos, e para que elas se desenvolvam, precisam de amônia como substrato. Existem algumas formas para se ter amônia no sistema em curto prazo, como adubação, adicionando peixe e alimentá-los com ração ou adicionar amônia diretamente. Para aclimatação rápida é utilizado também a introdução de substratos provenientes de outro sistema com bactérias desenvolvidas em massa, esse substrato é introduzido no biofiltro ou é colocado em saco de tecido e posteriormente pendurado dentro do tanque para ir liberando as bactérias. (SNATURAL, 2017).

O processo de filtração deve ser acompanhado realizando testes de amônia, nitrito e nitrato que podem indicar a atividade de cada etapa do processo de nitrificação. Quando a capacidade máxima de nitrogênio amoniacal total se estabiliza abaixo de 0,7 mg/L o biofiltro é considerado maduro e eficiente, processo que pode levar de 60 a 90 dias dependendo de variáveis como temperatura, método empregado, salinidade e outros (BAR-ZEEV et al., 2012).

3.4 MONTAGEM

No recipiente onde funcionará o biofiltro a entrada e saída de água devem ser protegidas por telas, impedindo a passagem de animais ou extravasamento da própria mídia. Após os cálculos de dimensionamento do biofiltro e quantificação dos substratos alternam-se as camadas de substratos considerando sua granulometria e flutuabilidade (DUARTE et al., 2013) (FIGURA 5).

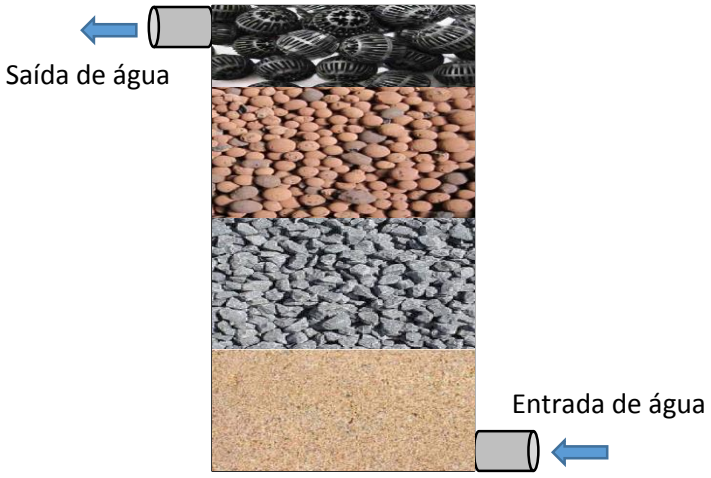

Figura 5 – Desenho esquemático representando as camadas do biofiltro. Na parte inferior do filtro a primeira camada é areia grossa, seguido de brita, argila expandida e mídia flutuante.
Fonte: Os autores.

4 FILTRAÇÃO FÍSICA

Os métodos de desinfecção física mais tradicionais envolvem o emprego do calor e da luz. A água aquecida até o ponto de ebulição elimina a maioria das bactérias que não formam esporos, porém, na aquicultura as lâmpadas que emitem radiação ultravioleta (UV) são mais usuais na desinfecção da água. Conforme o comprimento de onda diminui, a quantidade de energia produzida é maior. A luz ultravioleta possui o comprimento de onda entre 100 e 400 nanômetros (nm). A ação da radiação ocasiona danos a parede celular, altera a permeabilidade da célula, altera a natureza coloidal do protoplasma e inibe a atividade enzimática celular, ocorre a interferência na biossíntese e na reprodução celular causando danos fotoquímicos no DNA de bactérias e demais organismos patogênicos e indesejáveis, como algas, protozoários, vírus fungos e helmintos (COSTA, 2007; PIRES,1997).

A utilização do filtro UV é considerada com baixo custo de operação dependendo de suas aplicações, além da facilidade com manutenção e eficiência maior em mínimo tempo de contato quando comparado a outros agentes de desinfecção, porém, essa eficiência varia de acordo com o tempo de contato, intensidade de luz emitida e da característica do efluente (COSTA, 2007).

A emissão da radiação ocorre por meio de lâmpadas especiais (tubular, fluorescente) que podem ser classificadas como de baixa, média e alta pressão (MOURA et al., 2002).

Classificação das lâmpadas UV:

Baixa pressão: emitem comprimento de onda de apenas 185 e 250 nm. Possui potência de 30 W, 65 W e 105 W. A vida útil em geral é de 5000 a 8000 h e sua vaporização é parcial do mercúrio (PIRES, 2002)

Média pressão: emitem comprimento de onda de 180 a 400 nm. Possui potência de 5 kW e sua vaporização é total do mercúrio (PIRES, 2002).

Alta pressão: a lâmpada é composta por argônio/mercúrio e eletrodos epoxidados com comprimento de onda máximo na faixa de 365 a 366,3 nm (SOBOTKA, 1993).

5 FILTRAÇÃO QUÍMICA

5.1 ADSORÇÃO

A adsorção consiste na retirada da substância indesejada (adsorbato) da água por meio da adesão desta à superfície do adsorvente (FIGURA 6). Portanto, quanto maior a superfície de contato, mais eficiente é o adsorvente (LUCENA et al., 2018).

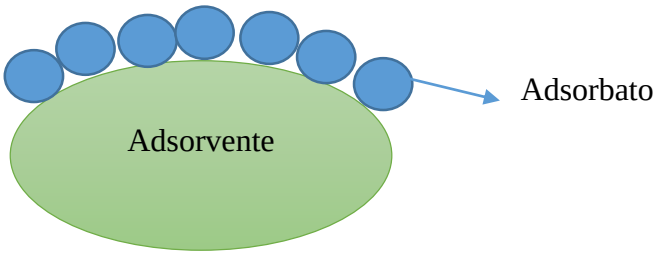

Figura 6 – Processo de Adsorção.
Fonte: Os autores.

A fim de que a adsorção ocorra, o adsorvente e o adsorbato devem possuir propriedades físicas e/ou químicas específicas. De acordo com a natureza das forças envolvidas o processo de adsorção pode ser classificado como fisissorção (adsorção física) ou quimissorção (adsorção química) (LUCENA et al., 2018).

No processo de fisissorção, o adsorbato e o adsorvente se aderem por meio da força de Van der Waalls, que é fraca e não forma ligação química, sendo caracterizado assim como um processo de adsorção reversível (LUCENA et al., 2018).

A quimissorção, por outro lado, envolve compartilhamento ou transferência de elétron entre o adsorvente e o adsorbato. Nessa reação química um novo composto é formado na superfície do adsorvente onde permanece ligado por forte atração eletrônica, considerado assim processo de adsorção praticamente irreversível (CARVALHO et al., 2003).

Um adsorvente muito comum nos tratamentos de água é o carvão ativado (CA), pois apresenta alta porosidade e elevada área de superfície (SILVA, 2017). Esses poros podem ser comparados à uma rede de túneis que se bifurcam sucessivamente (CLAUDINO, 2003) e pode ser visualizado na microscopia eletrônica (FIGURA 7).

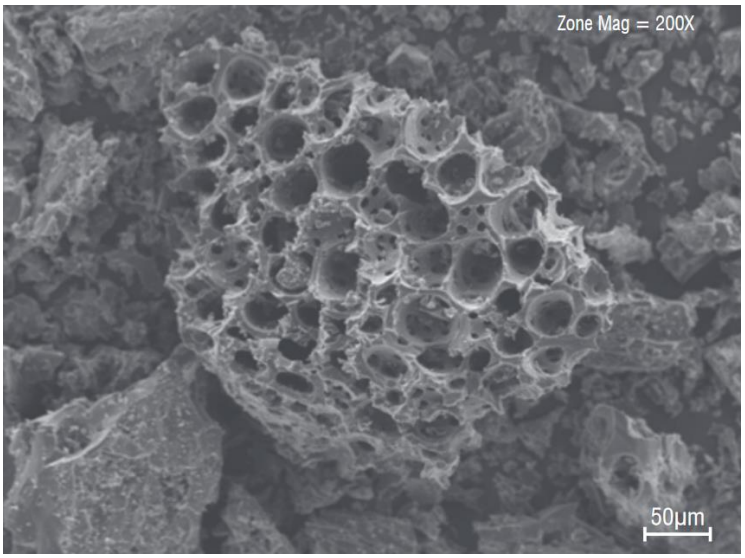

Figura 7 – Imagem de carvão obtida por meio de microscopia eletrônica de varredura.
Fonte: Pinto, Silva e Saraiva (2013).

Dentre as substâncias que o CA tem afinidade e, portanto, adsorve da água, estão aquelas que possuem fenóis em sua composição química. A água com componentes fenólicos, mesmo em baixas concentrações, apresenta odor e aparência característicos que podem ser melhoradas significativamente com a utilização do CA (SCHNEIDER, 2008).

5.2 TROCA IÔNICA

Nesse processo de filtragem, íons específicos presentes na água são filtrados para uma mídia filtrante, se alocando no espaço que anteriormente estava presente outro íon. Uma mídia filtrante muito utilizada no tratamento de água é a zeólita (ou zeolite), aluminossilicato hidratado por metais alcalinos ou alcalinos-terrosos, capaz de remover amônia e até metais pesados do sistema (SARDÁ, 2006).

A forma como a zeolite retira essas moléculas da água tem a ver com sua estrutura aberta, como uma gaiola (FIGURA 8). Ao longo do processo de filtragem, quando a água passa pelas zeolites, os íons de metais alcalinos ou alcalinos-terrosos, originalmente presos dentro delas, são trocados pelas moléculas de amônia ou metais presentes na água (WOODFORD, 2020).

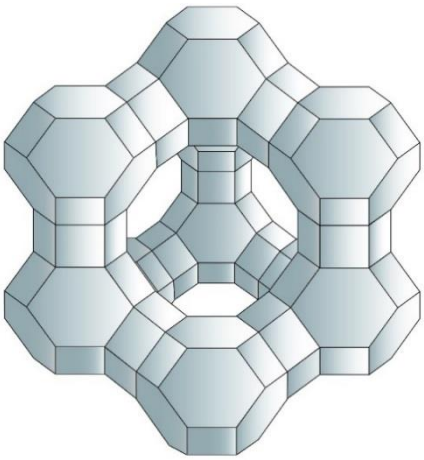

Figura 8 – Representação de, uma das muitas, formas geométricas da zeolite.
Fonte: NASA/MSFC, 2003.

Além da retirada de íons da água, as zeolites sintéticas se mostraram capazes de retirar bactérias da água, como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Shigella dysenteriae* (LI; MCCARTHY; DELETIC, 2014; MILAN et al., 2001; MPENYANA-MONYATSI et al., 2012).

Outro ponto positivo na zeolite é a relativa facilidade em reativá-la. Após saturada pelo processo de filtragem a zeolite pode ser regenerada e reutilizada até 20 vezes, como demonstrado por Zhang et al. (2017). Existem diversos métodos para fazer a regeneração (ou reativação) da zeolite, como banho em solução de NaCl (RAHMANI et al., 2004), solução de $Ca(OH)_2$ (JI; YUAN; LI, 2007) ou em mistura de NaClO-NaCl (ZHANG et al., 2017).

5.3 OXIDAÇÃO

Nas estações de tratamentos de água, a remoção de matéria orgânica é realizada por meio da oxidação química. Devido ao baixo custo e alto potencial oxidante, um dos oxidantes mais utilizados é o cloro (ROSALÉM et al., 2013).

Apesar do cloro se mostrar muito efetivo na remoção de cor, ferro e manganês, e reduzir sabor e odor da água (ROSALÉM et al., 2013) sua utilização possibilita gerar subprodutos halogenados, como clorofórmio (CHCl3), por exemplo (PASCHOALATO, 2005). Andreola et al. (2005) levantaram diversos estudos que associam trihalometanos presentes na água potável com a mortalidade por cânceres de estômago, bexiga e outros.

Outra opção para oxidação química é a utilização de Ozônio. Quando comparado ao cloro, tem menor potencial de formar trihalometanos, como demonstrado por Paschoalato,

Trimailovas e Di Bernardo (2008). Além de ter maior potencial de oxidação (2,07mV) que o cloro (1,36mV) (SILVA et al., 2011).

A aplicação do ozônio pode ser realizada por injetores do tipo Venturi (na tubulação da filtragem) ou através de difusores de bolha diretamente na água. De maneira bem resumida o processo consiste em um cilindro de oxigênio, que abastece o ozonizador. A reação de transformação de O_2 em O_3 ocorre quando o O_2 passa através de uma célula de ozônio, que é composta por 2 eletrodos (positivo e negativo) paralelos, revestido por um dielétrico de vidro ou cerâmica. A descarga elétrica que ocorre entre os dielétricos é chamada de corona ou plasma e é capaz de gerar elétrons com energia suficiente para quebrar moléculas de O_2 no átomo original de oxigênio que, ao se ligar com uma molécula de O_2, forma o ozônio (GLAZE; KANG; DOUGLAS, 2008).

Após sua incorporação na água, rapidamente ela é deteriorada, pois é uma molécula extremamente instável (GLAZE; KANG; DOUGLAS, 2008). Ao entrar em contato com compostos orgânicos presentes na água, o ozônio os oxida, tornando-os biodegradáveis e facilitando sua posterior filtragem biológica (PASQUALINI, 2010).

Propriedades relacionados a qualidade da água como temperatura, pH, dureza e até a própria concentração dos compostos na água podem afetar diretamente a efetividade da filtragem (ou taxa de oxidação do ozônio) (GONÇALVES; GAGNON, 2011).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando se fala em aquicultura o sucesso produtivo está intimamente ligado ao sistema de filtragem adotado. Seja por questões legais, como ocorre em pisciculturas com renovação constante de água, onde a filtragem não afeta diretamente o cultivo, porém, a legislação exige que a água do efluente tenha qualidade compatível com a que entra na produção. Seja por questões relacionadas diretamente ao desempenho animal ou intensificação da produção, visto que o dimensionamento correto do sistema de filtragem confere melhor qualidade de água e por consequência permite maior adensamento, além de possibilitar a plena expressão do potencial zootécnico da espécie produzida.

Cada tipo de filtragem (mecânica, biológica, física e química) desempenha papel específico, portanto, a adoção de um não substitui outro. Dessa forma, a utilização concomitante de mais de um método de filtragem é desejável, a depender do sistema de produção, portanto, é fundamental o planejamento, disposição e dimensionamento das estruturas, para que os métodos atuem de forma sinérgica.

7 REFERÊNCIAS

ANDREOLA, R. et al. Formação de trihalometanos em uma estação de tratamento de água. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 133-141, 2005.

BAR-ZEEV, E. et al. Rapids and filtration pretreatment for SWRO: microbial maturation dynamics and filtration efficiency of organic matter. **Desalination**, Amsterdam, v. 286, p. 120-130, 2012.

CALDEIRA, C. Q. **Diferentes tipos de substratos de biofiltro na larvicultura de tilápia do Nilo**. 2011. 36 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2011.

CARVALHO, F. O. et al. Uso de ensaios em laboratório como ferramenta metodológica no entendimento do processo de adsorção. In: 3rd INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENGINEERING AND COMPUTER EDUCATION, 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ICECE, 2003. p. 5.

CHEN, S.; LING, J.; BLANCHETON, J. P. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. **Aquacultural Engineering**, Honolulu, v. 34, n. 3, p. 179-197, 2006.

CLAUDINO, A. **Preparação de carvão ativado a partir de turfa e sua utilização na remoção de poluentes**. 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

COSTA, J. B. **Avaliação ecotóxicológica de efluente de tratamento secundário de esgoto sanitário após desinfecção com ácido peracético, cloro, ozônio e radiação ultravioleta**. 2007. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Programa de Pós Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

DUARTE, E. et al. Cultivo de pós-larvas de tilápia do Nilo utilizando diferentes proporções de substrato concha/brita no biofiltro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 20, n. 1, p. 43-48, 2013.

FONTÃO, C. R. Desenvolvimento de um protótipo de biofiltro para tratamento de água. In: I ENCONTRO ACADÊMICO DA ENGENHARIA AMBIENTAL DA EEL-USP, 2017. Lorena – SP. **Anais...** Lorena – SP: EEL. 2017. v 1, p. 5.

GLAZE, W. H.; KANG, J.; DOUGLAS, H. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. **Ozone: Science and Engineering**, Londres, v. 9, n. 4, p. 335-352, 2008.

GONÇALVES, A. A.; GAGNON, G. A. Ozone application in recirculating aquaculture system: an overview. **Ozone: Science and Engineering**, Londres, v. 33, n. 5, p. 345-367, 2011.

HELDBO, J. Sistemas de recirculação: a vanguarda da aquicultura dinamarquesa. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 25. n. 148. p. 27-36, 2015.

JI, Z. Y.; YUAN, J. S.; LI, X. G. Removal of ammonium from wastewater using calcium form clinoptilolite. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 141, n. 3, p. 483-488, 2007.

KUBITZA, F. Sistemas de recirculação: sistemas fechados com tratamento e reuso da água. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 95, p. 15-22, 2006.

LEKANG, O. I. **Aquaculture engineering**. 2. ed. Noruega: Wiley-Blackell, 2013.

LI, Y. L.; MCCARTHY, D. T.; DELETIC, A. Stable copper-zeolite filter media for bacteria removal in stormwater. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 273, p. 222-230, 2014.

LIMA, L. C.; KEBUS, M. J. Aquicultura em recirculação. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 109, p. 46-56, 2008.

LUCENA, G. et al. Potencial de uso do carvão devolatilizado da gaseificação como material adsorvente. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10, 2018, Santana do Livramento – RS. **Anais...** Santana do Livramento: Universidade Federal do Pampa, 2018. n. 4, p. 7.

MILAN, Z. et al. The removal of bacteria by modified natural zeolites. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, Londres, v. 36, n. 6, p. 1073-1087, 2001.

MOURA, A. et al. Avaliação do emprego da radiação ultravioleta na desinfecção de águas com turbidez e cor moderadas **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 37-47, 2002.

MPENYANA-MONYATSI, L. et al. Cost-effective filter materials coated with silver nanoparticles for the removal of pathogenic bacteria in groundwater. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Suiça, v. 9, n. 1, p. 244-271, 2012.

NASA/MSFC. **Diagram of zeolite crystals**, 2003. Disponível em: <https://archive.org/details/MSFC-0300114>. Acesso em: 12 jul. 2020.

OLIVEIRA, L. D. **Avaliação do processo de nitrificação em um filtro biológico aerado submerso alimentado com efluente de RALF**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Urbana) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Urbana, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

PASCHOALATO, C. F. P. R. **Efeito da pré-oxidação, coagulação, filtração e pós-cloração na formação de subprodutos orgânicos halogenados em águas contendo substâncias húmicas**. 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

PASCHOALATO, C. F. P. R; TRIMAILOVAS, M. R.; DI BERNARDO, L. Formação de subprodutos orgânicos halogenados nas operações de pré-oxidação com cloro, ozônio e

peroxônio e pós-cloração em água contendo substância húmica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 313-322, 2008.

PASQUALINI, L. N. **Estudo da oxidação de matéria orgânica de lixiviados de aterro sanitário por meio de tratamento com ozônio, peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta**. 2010. 144 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

PINTO, M. V. S.; SILVA, D. L.; SARAIVA, A. C. F. Obtenção e caracterização de carvão ativado de caroço de buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) para a avaliação do processo de adsorção de cobre (II). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 43, n. 1, p. 73-80, 2013.

PIRES, M. R. **Desinfecção de água para abastecimento com radiação ultravioleta**: eficiência bactericida e uma análise econômica e energética. 1997. 85 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento de Sistemas Energéticos) – Subcomissão de Pós Graduação de Planejamento de Sistemas Energéticos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

PIRES, M. R. **Desinfecção de esgotos com radiação ultravioleta**: influência da qualidade do efluente e da fotorreativação. 2002. 128 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

RAHMANI, A. R. et al. Investigation of ammonia removal from polluted waters by clinoptilolite zeolite. **International Journal of Environmental Science and Technology**, Tehran, v. 1, n. 2, p. 125-133, 2004.

ROSALÉM, S. F. et al. Avaliação de trihalometanos formados na etapa de pré-oxidação com cloro e permanganato de potássio em água de abastecimento. **Revista DAE**, São Paulo, n. 191, p. 54-59, 2013.

SARDÁ, L. G. **A utilização da zeólita na remoção de nutrientes do efluente de dejetos suínos**. 2006. 40 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Agronômica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SCHNEIDER, E. L. **Adsorção de compostos fenólicos sobre carvão ativado**. 2008. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.

SCOTT, P. Controle de efluentes. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 4, p. 8-9, 1991.

SILVA, M. C. M. **Avaliação da adsorção de cobre a partir de carvão ativado obtido quimicamente do bagaço de cana de açúcar**. 2017. 94 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

SILVA, S. B. da. et al. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 659-682, 2011.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Influência da luz, manejo e tempo de resistência sobre algumas variáveis limnológicas em um viveiro de piscicultura. **Biotemas**, Florianópolis, v. 8, n. 1, p. 61-71, 1995.

SNATURAL. **Tratamento de água e efluentes**: fazenda de peixe. São Paulo, 2017. Disponível em: <http://www.snatural.com.br/wp-content/uploads/2017/05/Manual-Criacao-Peixe.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2020.

SOBOTKA, J. The efficiency of water treatment and disinfection by means of ultraviolet radiation. **Water Science Technology**, Inglaterra, v. 27, n. 3-4, p. 343-346, 1993.

SOMERVILLE, C. et al. **Small-scale aquaponic food production**: integrated fish and plant farming. n. 589. Roma: FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, 2014.

SUMMERFELT, S. T.; VINCI, B. Solids capture. In: TIMMONS, M. B.; EBELING, J. M. **Recirculating aquaculture**. 2. ed. Ithaca, NY: Cauga Aqua Ventures. 2010. p. 177-244.

SUMMERFELT, S.; BEBAK-WILLIANS, J.; TSUKUDA, S. Controlled systems: water reuse and recirculation. In: WENDERMEYER, G. **Fish hatchery management**. 2. ed. Betesda, MD: American Fisheries Society. 2015. p. 285-395.

WOODFORD, C. **Zolites**. 2020. Disponível em: <https://www.explainthatstuff.com/zeolites.html>. Acesso em: 12 jul. 2020.

YAMAMOTO, Y. Characteristics of closed recirculating systems. In: TAKEUCHI, T. **Application of recirculating aquaculture systems in Japan**. Tokyo: Springer. 2017. p. 21-53.

ZHANG, W. et al. Optimization for zeolite regeneration and nitrogen removal performance of a hypochlorite-chloride regenerant. **Chemosphere**, Oxford, v. 178, p. 565-572, 2017.

Comportamento, bem estar e ambiência de animais aquáticos

Luiza Aparecida Campos de Paula[1]
Joyce Garcia Silva[2]
Layon Carvalho de Assis[3]
Leonardo Demier Cardoso[4]
Paola de Oliveira Santos[5]
Venan Vieira dos Anjos[6]
João Victor Nascimento Tardim[7]
Silvia Pope de Araujo[8]
Alberto Chambela Neto[9]
Pedro Pierro Mendonça[10]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: luzpaula.campos@gmail.com
[2] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: joyce_g_silva@hotmail.com
[3] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: layoncdeassis@gmail.com
[4] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: leonardodemier@hotmail.com
[5] Instituto Federal do Espírito Santo: e-mail: paolamanfredini111@gmail.com
[6] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: vieira.venan@gmail.com
[7] Instituto Federal do Espirito Santo, e-mail: jvntardim@gmail.com
[8] Universidade Federal do Rio de Janeiro, e-mail: silviapopedearaujo@gmail.com
[9] Instituto Federal do Espírito Santo: e-mail: chambela@ifes.edu.br
[10] Instituto Federal do Espírito Santo, e-mail: ppierrom@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Desde o século passado, ocorreu uma intensificação em relação à pesquisas com o bem-estar dos animais de produção, isso, devido à grande demanda por parte dos consumidores, que visão na atualidade por produções onde se proporciona conforto e bem-estar aos animais (BROOM, 1986).

A definição do termo bem-estar tende a ser uma ampla discussão, que possui diversos conceitos na área de pesquisa (TANNEMBAUM, 1995). De forma prática, bem-estar pode ser definido de acordo com Broom (1986) sendo "O estado em que o indivíduo se encontra em relação às suas tentativas de se adaptar ao seu ambiente".

O Brasil encontra-se entre os 15 maiores produtores de peixes do mundo, sendo a piscicultura a atividade zootécnica que mais se desenvolve no país, possuindo estimativa de crescimento de até 52,9% do ano de 2016 até 2030. Entretanto, ocorre perda mundial significativa deste produto durante o período pós-captura, atingindo valores estimados de 27% de desperdício do pescado produzido (FAO, 2018).

Como grande parte das criações de animais para fins de produção, a piscicultura segue o princípio de produzir o máximo e visar maior lucro, porém muita vezes sem se atentar ao estado de bem-estar dos animais envolvidos neste processo. Diante disso, se faz necessário entender que a produtividade deve estar associada à preservação do meio ambiente e às boas condições sanitárias, características inerentes a um bom rendimento no processamento de peixes, o que resulta em boas práticas de produção e bem-estar (HUNTINGFORD et al., 2006).

O setor de aquicultura e comércio de organismos aquáticos movimentam milhões de dólares anualmente. O estado de Minas Gerais vem se destacando a níveis de produção de ornamentais, sendo referência a região da Zona da Mata Mineira, com ênfase nos municípios de Muriaé e Vieira com cerca de 250 produtores na região (CARDOSO; IGARASHI, 2010). Com a ampla diversidade em relação às espécies de peixes ornamentais, em diferentes formas e tamanhos, algo a se destacar são os poucos trabalhos na literatura referentes a estes animais, considerando principalmente o aspecto de bem-estar (SAXBY et al., 2010).

Abordar o bem-estar de peixes é uma das questões mais desafiadoras no âmbito do bem-estar animal, uma vez que esses grupos de indivíduos apresentam anatomia, fisiologia e comportamento muito diferentes entre si. Sendo importante perceber que estas diferenças significam que espécies diferentes de peixes irão reagir diferentemente a situações similares. Tal fato exige que haja conhecimentos espécie específicos para se elaborar um material que analisa de forma adequada o bem-estar desses indivíduos, ou seja, peixes não podem ser

tratados como espécie única quando se trata de regulamentações e legislações que regem o bem-estar durante o abate e até perante a própria piscicultura (EFSA, 2004).

2 SENCIÊNCIA

De forma simples, a senciência é a capacidade do animal de percepção dentro do ambiente em que está exposto, tanto de forma positiva como também de forma negativa. Isso ocorre quando o animal faz associação com objetos ou imagens presentes naquele ambiente, originando lembranças ou antecipações futuras para suas ações. Existem trabalhos na literatura em que os peixes apresentaram comportamentos que indicavam a capacidade de expressar a memória e aprendizagem (DEL-CLARO; PREZOTO; SABINO, 2004).

Cientificamente não há comprovações que os peixes possuam a senciência, mas é evidente que estes animais se mostram desconfortáveis quando se encontram alojados em locais que ocorrem falhas no manejo apropriado, o que afeta diretamente o desenvolvimento destes animais e até mesmo podendo levar os animais a morte. Sendo assim, a ciência ainda não conseguiu provar que eles possuem capacidade de compreender o sofrimento, mas também não conseguiu demonstrar a ausência de senciência nesses animais. Logo, esses devem ser tratados como sencientes para evitar equívocos éticos futuros (VOLPATO; CASTILHO, 2007).

A utilização do enriquecimento ambiental em aquários é uma estratégia determinante para se avaliar o bem-estar em variadas dimensões para o animal. Os testes de preferência simulam diversas situações a serem escolhidas pelos mesmos, o que pode auxiliar também na definição dos objetos relevantes para o animal conforme a sua afinidade (VOLPATO; CASTILHO, 2007).

3 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

O enriquecimento ambiental tem a função de trazer bem estar aos animais criados em cativeiros, fazendo-os interagir com o ambiente estimulando o comportamento natural de cada espécie (VOLPATO; CASTILHO, 2007). Segundo Rodrigues (2019) ambiente enriquecido faz o animal desenvolver capacidade de aprendizado mais rápido do que no ambiente não enriquecido e sem atividade. Para enriquecer o ambiente são utilizados: plantas artificiais, labirintos, cascalhos, conchas, plantas vivas, enfeites coloridos, nutrientes e caixa de cultivo com formas diferentes, estimulando os organismos a praticarem atividades.

Os estímulos devem diminuir comportamentos estereotipados (comportamentos anormais) e aumentar tipos de comportamentos normais ou comportamentos inatos da espécie. Para se obter resultados positivos é ideal estudar a espécies, idade, sexo, habitat e hábitos alimentares. O ambiente aquático não enriquecido é aquele que dentro da sua estrutura possui apenas água e peixe. O ambiente aquático enriquecido é aquele que contém dentro da sua estrutura, peixes, substratos como plantas aquáticas, plantas artificiais, pedras, conchas entre outros (VOLPATO; CASTILHO, 2007).

4 SISTEMA CONVENCIONAL E SISTEMA CONTROLADO: VANTAGENS E DESVANTAGENS

O cultivo de organismos aquáticos pode ser realizado em sistema de cultivo aberto ou fechado em diferentes formatos e formas: tanques de alvenaria, viveiros escavados, tanque rede e aquários. A aquicultura convencional geralmente é em ambiente aberto, e o custo de implantação é moderado, no entanto restos de ração e excretas dos organismos aquáticos ficam dentro do sistema, acumulando nutrientes e aumentando a toxicidade (SEBRAE, 2015).

Vantagens: investimento inicial baixo, poli cultivo, controle de entrada e saída de água, aproveitamento do alimento natural e redução na oferta de ração. Desvantagens: maiores volumes de efluentes descartados, alto consumo de água, não tem controle dos parâmetros físicos químicos da água, maior risco sanitário (SEBRAE, 2015).

O ambiente controlado geralmente acontece nos sistemas fechados com recirculação de água dentro de laboratórios, galpões ou em estufas. Utiliza-se sistemas de filtragem, termostato, aerador, plantas aquáticas, aquecedores, pedras, plantas artificiais e controle da qualidade de água, fazendo o ambiente ficar próximo ao natural, trazendo mais conforto aos animais. O ambiente controlado tem o intuito de trazer mais conforto aos animais deixando os parâmetros de qualidade de água na faixa ótima ou próxima à mesma (SILVA; LOSEKANN; HISANO, 2013).

Vantagens: implementação de tecnologias, menor risco sanitário, redução na troca de água e maior controle na qualidade de água. Desvantagens: investimento inicial elevado comparado ao sistema convencional, exigência de mão de obra qualificada, altas densidades por tanque, maior gasto de energia (OZÓRIO; AVNIMELECH; CASTAGNOLLI, 2004).

Em ambiente convencional o animal não sofre estímulos assim não desperta tantos comportamentos. O ambiente controlado enriquecido com substratos e parâmetros físicos químicos da água controlados estimulam o comportamento inato e aprendido nos animais por

seu ambiente de cultivo estar próximo ao natural favorecendo o bem estar animal (OZÓRIO; AVNIMELECH; CASTAGNOLLI, 2004).

5 COMPORTAMENTO

Milhares de anos atrás nossos ancestrais observavam o comportamento dos animais e entenderam que era necessário aprender os comportamentos básicos para ter uma melhoria na captura, no cultivo ou na finalidade de resolver algum problema (TEIXEIRA; BARÇANTE; AZEVEDO, 2018). Caçadores e pescadores no passado passaram a observar os hábitos dos animais com o intuito de minimizar suas tarefas. Para o pescador era importante saber que o salmão não morde a isca quando está com desova. Aquele que aprendeu os primeiros aspectos do comportamento animal obteve vantagens na pesca e na caça (FERRAZ, 2011).

O comportamento é toda ação motora de um animal com o ambiente (GOUVEIA JR; MAXIMINO; BRITO, 2006). O comportamento animal é de característica ontogênica, em que a evolução modificou o padrão ancestral e sua reconfiguração em padrão moderno (TEIXEIRA; BARÇANTE; AZEVEDO, 2018). O comportamento inato é aquele que vem de nossos ancestrais e são geneticamente herdados dos pais para o organismo e o comportamento adquirido não é herdado, ele é desenvolvido durante a vida do organismo podendo ser resultado de experiência ou por influência ambiental (DEL-CLARO; PREZOTO; SABINO, 2004).

A aprendizagem desperta uma característica essencial em todo ser vivo e permite sua adaptação ao meio. A aprendizagem quando para, e passa a suceder e se modificar ao longo do tempo (aquisição), garante a ocorrência do comportamento constante em dada situação (mantença ou memória). A aprendizagem respondente ou pavloviana é quando o comportamento existe previamente sob o controle de um estímulo neutro após o treino do operante ou instrumental, ou seja é quando a resposta fica controlado sob consequência após o treino (GOUVEIA JR; MAXIMINO; BRITO, 2006).

Segundo Del-Claro, Prezoto e Sabino (2004) a análise comportamental é feita por meio de técnicas: animal focal, sequência, amostragem de todas as ocorrências ou instantâneas. Os peixes em situação de estresse expressam comportamentos que são detectados visualmente ou por meio do nível de cortisol. Selye (1950) relata que o estresse pode ser dividido em três etapas: a reação alarme, resposta inicial ao estímulo e que desperta uma séria de alterações fisiológicas, a resistência, resposta fisiológica para retorno a homeostase, e a exaustão, duração dos distúrbios causados pelos agentes estressantes, quando o limite é excedido o animal fica susceptível a patógenos ou que podem leva-lo à morte.

Fatores estressores interferem na homeostase dos peixes tornando-os mais suscetíveis a alto nível de estresse podendo acarretar doenças ou mortalidade. Os agentes estressores são: mudança brusca de temperatura, transporte, baixa qualidade de água, predadores, manejo inadequado, falta de parceiro sexual, adaptação ao ambiente e disputa por alimento (BARTON, 2002).

Cada organismo aquático possui características específicas de faixa ótima de conforto, os parâmetros físicos e químicos da água influenciam diretamente na produção. Os parâmetros mais analisados são: temperatura, oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade, dureza, amônia, transparência e turbidez (BARTON, 2002).

As respostas primárias estão ligadas aos hormônios estimulando o eixo hipotálamo o centro integrativo cerebral, fisiologica e bioquimicamente, resultando no nível de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). A resposta secundária aumenta o débito cardíaco da capacidade de transportar oxigênio. A resposta terciária inibe o crescimento do animal atingindo o desempenho zootécnico, aumentando a susceptibilidade a doenças e mudanças no comportamento (FIGURA 1) (URBINATI; CARNEIRO, 2004).

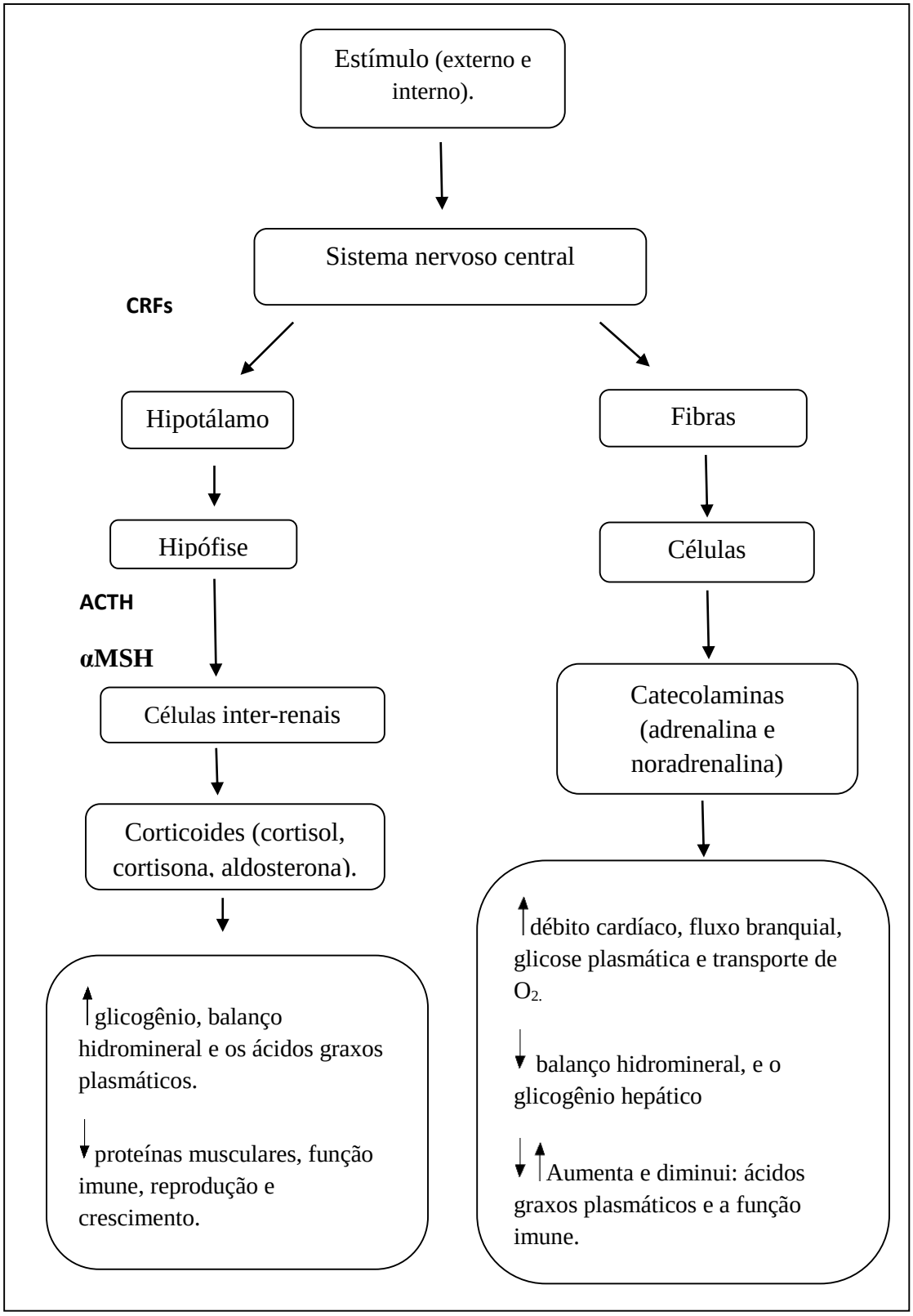

Figura 1 – Diagrama ilustrativo das respostas ao estresse (externo e interno) ACTH: hormônio adrenocorticotrófico; CRF: fatores liberadores corticotróficos; αMSH: hormônio melanócito estimulante; ↑ efeito estimulatório, ↓ efeito inibitório e ↑↓estimula e inibe.
Fonte: Adaptado de Wendelaar-Bonga (1997).

Algumas espécies de peixes apresentam sensores físicos ou químicos para determinados estímulos os campos elétricos estimulam a eletro comunicação e eletro recepção. Peixes solitários estabelecem hierarquias, que formam casais e ninhos. A reprodução pode ser partenogênese, ovovivípara ou ovípara pode ter cuidado parental com o filhote ou não (GOUVEIA JR; MAXIMINO; BRITO, 2006).

O peixe *Gymnotus* sp (Carapó ou tuvira) conhecido como peixe elétrico ele utiliza o campo eletromagnético para se localizar no ambiente (GOUVEIA JR; MAXIMINO; BRITO, 2006). O tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanque escavado sem aeração se deslocaram à superfície em busca de oxigênio e obteve tamanho e peso menor comparado ao tanque com oxigênio e grande parte desenvolveu o prolapso labial (SOARES, 2014). A tilápia (*Oreochromis niloticus*) cultivada em caixa d'água com 8 tijolos perfurados teve aumento no consumo de ração devido a menor taxa de estresse com a adição do substrato (BRITO et al., 2016).

6 BEM ESTAR ANIMAL E ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL APLICADO AO AQUARISMO

Por séculos o aquarismo tem sido um passatempo popular em todo o mundo e, à medida que aumentam as restrições de extração dos animais de seus habitats naturais, a aquicultura com foco no mercado ornamental tende a continuar seu crescimento (LADISA; BRUNI; LOVATELLI, 2017). Apesar de ser um mercado bilionário em expansão, as informações a respeito dele são escassas. O reflexo disso são estudos orientados em referências defasadas com mais de 10 anos (STEVENS et al., 2017).

Estima-se que, anualmente, mais de 2 bilhões de peixes ornamentais sejam transportados (MONTICINI, 2010). Ressalta-se que durante esse delicado processo da cadeia de suprimento maior atenção é requerida, pois os processos fisiológicos do animal levam à piora na qualidade da água (SAMPAIO; FREIRE, 2016). E água de baixa qualidade afeta diretamente o sistema imune dos peixes, aumentando a suscetibilidade à doenças e podendo leva-los a morte (CROSBY et al., 2006).

Um manejo comumente indicado para antes da realização do transporte é o jejum, com a finalidade de, além de diminuir as excretas, reduzir o consumo de oxigênio (FREIRE et al., 2019). Vários estudos mostram que animais em jejum tem o nível de cortisol aumentado (BARCELLOS et al., 2010; CARUSO et al., 2012; COSTAS et al., 2011), situação que poderia ser contornada com dietas específicas, como demonstrado por Forsatkar et al. (2017) no estudo

com privação alimentar de peixe-zebra. No estudo foi evidenciado a redução dos comportamentos semelhantes à ansiedade e a produção de cortisol em resposta à dieta com inclusão de prebióticos. Os autores esclarecem, porém, que ainda há muito para se estudar e compreender, não somente das tantas outras espécies de interesse comercial, mas também da relação existente entre a privação alimentar e a microbiota intestinal.

Superadas as fases de produção, transporte e venda, a qual o aquarista não participa diretamente, chega a hora de compor o aquário, e muitas variáveis devem ser consideradas a partir daí. Uma das mais importantes é a qualidade da água. Cada espécie tem suas necessidades que devem ser atendidas, sendo as mais importantes temperaturas, pH, amônia, nitrito, nitrato, alcalinidade, dureza e oxigênio dissolvido. É necessário manter esses parâmetros dentro do limite de conforto para garantir a sobrevivência dos animais (NÄSLUND; JOHNSSON, 2016).

A prática do aquarismo busca muito além do que somente a sobrevivência dos pets, objetiva-se criar um ambiente com ciclo biológico complexo, que traga benefícios para os peixes e que seja esteticamente atraente ao aquarista (NÄSLUND; JOHNSSON, 2016).

Apesar disso, alguns equívocos ainda são cometidos, como por exemplo com os peixes betas machos. Devido sua natureza agressiva, são geralmente criados sozinhos em pequenas beteiras (aprox. 3L) com pouco ou, muitas vezes, nenhum enriquecimento ambiental. No entanto é recomendado que os aquários sejam espaçosos, outras espécies podem compor sua fauna e é aconselhável vegetação como enriquecimento ambiental, uma vez que há densa vegetação em seu habitat natural (PLEEGING; MOONS, 2017).

Outro importante aspecto é o fornecimento de abrigos (sejam rochas, tubos de PVC ou vegetação mais densa) que desempenha várias funções no aquário, como: mimetizar o ambiente natural; reduzir possíveis estresses causados pela movimentação humana no ambiente e contato visual com outros indivíduos da mesma espécie. Uma vez que os abrigos servem como loca de proteção e; reduzem a agressividade, pois os animais têm o contato visual entre eles restringidos (NÄSLUND; JOHNSSON, 2016).

A utilização de substrato no fundo do aquário pode influenciar os animais de maneira positiva, conforme foi evidenciado por Batzina e Karakatsouli (2012), ao realizarem estudos com o uso de substratos de colorações diferentes na recria de *Sparus aurata* . Os autores notaram menor agressividade em todos os tratamentos com substrato e melhor desenvolvimento zootécnico para determinadas colorações de substrato (azul e marrom avermelhado). Resultados atribuídos de melhor desempenho devido à coloração ser semelhante ao habitat natural da espécie.

Uma interessante estratégia de enriquecimento ambiental que também deve ser considerada ao compor o aquário é a quantidade de indivíduos de cada espécie. Alguns animais como o acará-bandeira, por exemplo, durante boa fase da vida atuam bem em cardumes, porém quando adultos, após formarem casal, devem ser isolados em um aquário para o acasalamento (ROCHA, 2014).

É importante ressaltar que a complexidade da composição do aquário ajuda no desenvolvimento e aprendizado dos animais, como demonstrado por Von Krogh et al. (2010) e Salvanes et al. (2013) que associaram a criação de peixes em aquários com enriquecimento ambiental a proliferação de células cerebrais, o que é indicativo de ganho cognitivo. Esses estímulos sensoriais são sempre bem-vindos no aquarismo, visto que os peixes irão interagir mais com o ambiente e trazer uma experiência ainda mais interessante para o aquarista.

Assim como parâmetros de qualidade de água, o tipo de enriquecimento ambiental deve ser escolhido de acordo com a espécie de interesse. Por isso é fundamental que, ao escolher a fauna que irá compor o aquário, conhecer a origem das espécies, para que o ambiente possa ser criado de maneira à fornecer substratos, abrigos, vegetação e todo o tipo de enriquecimento ambiental que melhor mimetizem o ambiente natural, elevando assim o bem estar animal (SALVANES et al., 2013)

Apesar de ainda poucos, bons trabalhos vêm contribuindo para o melhor entendimento das necessidades de algumas espécies (TABELA 1) e amparem o desenvolvimento dos aquários.

Tabela 1 - Lista de espécies com preferências de enriquecimento ambiental (continua).

Nome popular	**Nome Científico**	**Preferência/Sugestões**
Kinguio; Japonês; Peixe-dourado	*Carassius auratus*	Preferência por areia fina como substrato e a planta Valisneria (*Valisneria spiralis*) (PEREIRA et al., 2018).
Midas; Ciclídeo Midas	*Amphilophus citrinellus*	Aquários grandes e com habitat complexo (enriquecido) induz a diminuição da agressividade. (OLDFIELD, 2011).
Beta	*Betta splendens*	Preferência por ambiente de coloração azul, sem substrato e com abrigo. Preferência por plantas: Elódea (*Egeria brasiliensis*) e Orelha (*Salvinia auriculata*). (BONIFÁCIO, 2019).
Oscar	*Astronotus ocellatus*	Preferência pela cor azul, substrato leves como areia e conchas, telha como abrigo e para vegetação a falsa-alisma (*Heteranthera reniformis*). (OLIVEIRA , 2016).

Tabela 1 - Lista de espécies com preferências de enriquecimento ambiental (conclusão).

Nome popular	Nome Científico	Preferência/Sugestões
Paulistinha; Peixe-zebra	*Danio rerio*	Enriquecer com o aquário com plantas e galhos (ou similares) para estímulos sensoriais. (VON KROGH et al., 2010).
Tilápia-do-Nilo	*Oreochromis niloticus*	Preferência por sedimento natural de rio no fundo do aquário – como areia, por exemplo. (FREITAS, 2011).
Jundiá	*Rhamdia quelen*	Evitar iluminação verde, pois aumenta concentrações de cortisol no sangue (stress). (BARCELLOS et al., 2006).

Fonte: Os autores.

3 REFERÊNCIAS

BARCELLOS, L. J. G. et al. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 300, n. 1-4, p. 231-236, 2010.

BARCELLOS, L. J. G. et al. The color of illumination effects the stress response of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, Heptapteridae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1249-1252, 2006.

BARTON, B. A. Stress in fish: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, United Kingdon, v. 42, n. 3, p. 517-525, 2002.

BATZINA, A.; KARAKATSOULI, N. The presence of substrate as a means of environmental enrichment in intensive lyrea red gilthead sea bream *Sparus aurata*: growth and behavior all effects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 370, p. 54-60, 2012.

BONIFÁCIO, C. T. **Comportamento e bem-estar de peixe beta (*Betta splendens*) em aquário**. 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2019.

BRITO, J. M. de. et al. Custos de produção de alevinos de tilápias-do-Nilo cultivadas em água com enriquecimento ambiental. **Cadernos de Agroecologia**, Seropédica, v. 10, n. 3, p. 1-5, 2016.

BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, London, v. 142, p. 524-526, 1986.

CARDOSO, R. S.; IGARASHI, M. A. Aspectos do agronegócio da produção de peixes ornamentais no Brasil e no mundo. **PUBVET**, Londrina, v. 3, n. 14, p. 40-42, 2010.

CARUSO, G. et al. Short fasting and refeeding in red porgy (*Pagrus pagrus*, Linnaeus 1758): response of some hematological, biochemical, and non-specific immune parameters. **Marine Environmental Research**, Inglaterra, v. 81, p. 18-25, 2012.

COSTAS, B. et al. Feed deprivation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles: effects on blood plasma metabolites and free amino acid levels. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 495-504, 2011.

CROSBY, T. C. et al. On-farm transport of ornamental fish. **University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences Extension Publication FA119**, Flórida, v. 2006, n. 34, p. 1-7, 2006.

DEL-CLARO, K.; PREZOTO, F.; SABINO, J. **Comportamento animal**. uma introdução à ecologia comportamental. Jundiaí: Livraria Conceito, 2004.

FORSATKAR, M. N. et al. Effects of the prebiotic mannan-oligosaccharide on the stress response of feed deprived zebrafish (*Danio rerio*). **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 180, p. 70-77, 2017.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Opinion of the scientific panel on animal health and welfare (AHAW) on a request from the commission related to welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals. **EFSA Journal**, Parma, n. 45, p. 1-29, 2004.

FAO. **The State of world fisheries and aquaculture**. 2018. Disponível em :< http://www.fao.org/fishery/sofia/en> Acesso em: 04 abr. 2020.

FERRAZ, M. R. **Manual de comportamento animal**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2011.

FREIRE, M. V. C. et al. Transporte de organismos aquáticos: procedimento fundamental para desenvolvimento da aquicultura. **PUBVET**, Maringá, v. 13, n. 9, p. 176-185, 2019.

FREITAS, R. H. A. **Avaliação do bem-estar da tilápia-do-Nilo a partir do esforço para obtenção de condições de preferência**. 2011. 85 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Programa de pós graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

GOUVEIA JR, A.; MAXIMINO, C.; BRITO, T. M. **Comportamento de peixes**: vantagens e utilidades nas neurociências. Bauru: Faculdade de Ciências/UNESP. 2006.

HUNTINGFORD, F. A. et al. Current issues in fish welfare. **Journal of Fish Biology**, London, v. 68, n. 2, p. 332-372, 2006.

LADISA, C.; BRUNI, M.; LOVATELLI, A. Overview of ornamental species aquaculture. **FAO Aquaculture Newsletter**, Roma, n. 56, p. 39-40, 2017.

MONTICINI, P. **The ornamental fish trade**: production and commerce of ornamental fish: technical-managerial and legislative aspects. v. 102. Rome: FAO, 2010.

NÄSLUND, J.; JOHNSSON, J. I. Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. **Fish and Fisheries**, Leicester, v. 17, n. 1, p. 1-30, 2016.

OLDFIELD, R. G. Aggression and welfare in a common aquarium fish, the *Midas cichlid*. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, Londres, v. 14, n. 4, p. 340-360, 2011.

OLIVEIRA, A. P. G. **Comportamento do peixe *Astronottus ocellatus* (Agassiz, 1861) submetidos a enriquecimento em aquário**. 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

OZÓRIO, R. O. A.; AVNIMELECH, Y.; CASTAGNOLLI, N. Sistemas intensivos fechados de produção de peixes. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 7-24.

PEREIRA, R. M. et al. Preferência por diferentes ambientes do peixe ornamental japonês (*Caracius auratus*) como mecanismo indicador de bem-estar. **Cadernos de Agroecologia**, Seropédica, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2018.

PLEEGING, C. C. F.; MOONS, C. Potential welfare issues of the siamese fighting fish (*Betta splendens*) at the retailer and in the hobby ist aquarium. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, Amsterdam, v. 86, n. 4, p. 213-223, 2017.

ROCHA, M. J. S. **Emprego de sistema intensivo em aquários para a criação do acará-bandeira, (*Pterophyllum scalare*, Lichtenstein 1823)**. 2014. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Pesca) - Campus Arapiraca, Curso de Engenharia de Pesca, Universidade Federal de Alagoas, Penedo, 2014.

RODRIGUES, F. P. Influência do enriquecimento ambiental e da atividade física no condicionamento operante de peixes *Danio rerio*. **Revista Científica UMC**, Mogi das Cruzes, v. 4, n. 3, p. 1-3, 2019.

SALVANES, A. G. V. et al. Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 280, n. 1767, p. 1-7, 2013.

SAMPAIO, F. D. F; FREIRE, C. A. An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. **Fish and Fisheries**, Leicester, v. 17, n. 4, p. 1055-1072, 2016.

SAXBY, A. et al. The effect of group size on the behavior and welfare of four fish species commonly kept in home aquaria. **Applied Animal Behaviour**, Amsterdam, v. 125, p. 195-205, 2010.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal**, London, v.1, n. 4667, p. 1383-1392, 1950.

SILVA, M. S. G. M.; LOSEKANN, M. E.; HISANO, H. **Aquicultura**: manejo e aproveitamento de efluentes. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente-Documentos (INFOTECA-E), 2013.

SEBRAE. **Aquicultura no Brasil**: série de estudos mercadológicos. Brasília: SEBRAE, 2015.

SOARES, M. O. **Efeito da aeração mecânica na qualidade da água e glicemia de tambaquis criados em tanques escavados**. 2014. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal de Rondônia, Presidente Médici, 2014.

STEVENS, C. H. et al. Stress and welfare in ornamental fishes: what can be learned from aquaculture? **Journal of Fish Biology**, London, v. 91, n. 2, p. 409-428, 2017.

TEIXEIRA, C. P.; BARÇANTE, L.; AZEVEDO, C. S. **Comportamento animal**: uma introdução aos métodos e à ecologia comportamental. Curitiba: Appris Editora, 2018.

TANNEMBAUM, J. **What is animal welfare? Veterinary ethics: animal welfare, client relations, competition and collegiality**. 2 ed. Saint Louis: Mosby, 1995.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 171-194.

VOLPATO, G. L.; CASTILHO, M. F. Brief review and new insights on the concept of fish welfare. **Diseases of Aquatic Organisms**, Berlin, v. 75, p. 165-171, 2007.

VON KROGH, K. et al. Fore brain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 101, n. 1, p. 32-39, 2010.

WENDELAAR-BONGA, S. E. The stress response of fish. **Physiological Reviews**, Bethesda, n. 77, p. 591-625, 1997.

Importância da necropsia de peixes como indicadores da saúde ambiental

César Oliveira Liesner[1]
Júlio Francisco Valiati Marin[2]
Adriano Lima Stelzer Bindaco[3]
Jankerle Neves Boeloni[4]
Louisiane de Carvalho Nunes[5]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: cesarliesner01@hotmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: julio_valiati@hotmail.com
[3] Universidade Vila Velha, e-mail: adrianostelzer48@gmail.com
[4] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: jankerle@gmail.com
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: louisianecn@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Os organismos aquáticos em geral, possuem papel importantíssimo na natureza como indicadores de saúde do ambiente (LINEY et al., 2006). Sabe-se que a água é um dos recursos naturais mais abundantes no Planeta, com cerca de 1.265.000 trilhões de metros cúbicos, porém, a quantidade de água disponível para o uso humano representa pequena porcentagem, distribuída em águas subterrâneas, lagos, rios e córregos (BOTKIN; KELLER, 2000).

No ambiente aquático, há uma fonte enorme e variável de contaminação, indo desde efluentes industriais, processos de drenagem agrícola (fertilizantes, agrotóxicos), derramamentos acidentais e não acidentais de lixos químicos (metais pesados, compostos orgânicos e inorgânicos), a lixos domiciliares que acabam por chegar aos rios e mares, gerando a contaminação dos ecossistemas aquáticos. Desta forma, as plantas aquáticas, algas, crustáceos, moluscos, peixes, mamíferos, aves, entre outros, podem ser alvos de estudos, uma vez que essa biota aquática está constantemente exposta a grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente (RASHED, 2001).

Os peixes, por estarem constantemente expostos a vários estressores, que incluem patógenos, variações de temperatura da água, *blooms* de algas tóxicas e má qualidade da água, passaram a ser importantes indicadores da saúde ambiental (SILVA et al., 2002). Esses estressores ambientais também podem influenciar de forma direta ou indireta a ocorrência de doenças infecciosas em peixes, propiciar aumento da virulência dos patógenos oportunistas e dar resistência aos hospedeiros (PENTTINEN et al., 2016).

Neste contexto, o exame necroscópico de peixes se torna fundamental para identificar doenças, investigar a etiopatogenia das alterações observadas e, consequentemente, buscar possíveis estressores que possam estar envolvidos nas causas das doenças (WERNERSSON et al., 2015). Além do mais, exames complementares também são necessários para a conclusão da investigação como, por exemplo, histopatológico, bacteriológico, virológico, micológico, tóxicológico, parasitológico, dentre outros (FISCHER; BRITO, 1989).

Diante do exposto, objetivou-se realizar revisão de literatura sobre o exame necroscópico em peixes, constituído pelas normas técnicas para a realização do procedimento assim como os métodos de coleta para execução de exames complementares em peixes, uma vez que esses animais apresentam grande importância para o ecossistema aquático como indicadores de saúde ambiental.

2 ANATOMIA E FISIOLOGIA DOS PEIXES

O processo evolutivo dos vertebrados aquáticos, levou ao desenvolvimento anatômico com suas características fisiológicas distintas, que compreende a forma hidrodinâmica, corpo fusiforme (corpo alongado e achatado na lateral), cauda, escamas e presença de muco para sua proteção. Externamente o corpo dos peixes é composto por boca, narina, olho, opérculo, barbatanas ou nadadeiras e ânus. Internamente é constituído por dentes, brânquias, coração, faringe, fígado, estômago, intestino, gônadas, bexiga urinária, bexiga natatória, rim, coluna vertebral, medula espinhal e cérebro (PASCKE; LANZENDORF, 2017).

Possuem o revestimento do corpo por pele ou escamas, a respiração é branquial, feita por brânquias, ou pode ser pulmonada, possuem ainda brânquias reduzidas e respiram pelos pulmões (por exemplo, a piramboia) (BONE; MARSHALL, 1982; PASCKE; LANZENDORF, 2017).

De modo geral possuem sete nadadeiras, sendo três ímpares (dorsal, anal e caudal) e duas pares (peitorais e ventrais). As nadadeiras são de fundamental importância para a locomoção, cada uma com funções específicas, manutenção do equilíbrio e estabilidade na água, repouso, cortejo da reprodução, cópula, além de manter o fluxo de água nos ovos para que forneça aeração e movimentação dos mesmos (FIGURA 1). Assim, as nadadeiras apresentam funcionalidades distintas para ajudar nos movimentos do corpo dos organismos aquáticos (HICKMAN JÚNIOR; ROBERTS; LARSON, 2004).

A linha lateral é um órgão sensorial, facilmente identificado devido ao seu posicionamento nos flancos laterais, que pode ser formada por escamas com poros ou abertura na pele em peixes não escamosos, expondo os neuromastos para o meio externo. Os opérculos são placas ósseas localizadas nas laterais da cabeça, onde servem de proteção para as brânquias, podendo ser lisos ou impregnados por cristas, cobertos por escamas ou espinhos (BONE; MARSHALL, 1982).

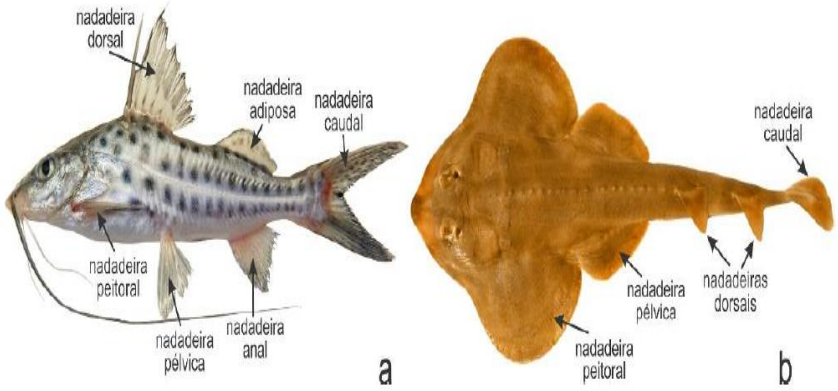

Figura 1 – Representação esquemática das nadadeiras em peixe ósseo (a) e peixe cartilaginoso (raia) (b).
Fonte: Adaptado de Bemvenuti e Fischer (2010).

Os dentes podem ser classificados como: caninos, viliformes, incisivos, bucais, achatados, triangulares, cortantes, molariformes, faringianos e mandibulares. A estrutura da boca pode ser classificada em: dorsal, terminal, semi-ventral e ventral (BEMVENUTI; FISCHER, 2010).

A morfologia do trato digestório varia muito, dependendo da espécie e pode apresentar outras diferenças de dimensões e aparência, dado que os peixes, possuem uma diversidade de hábitos alimentares sendo eles: planctófagos, herbívoros, frugíveros, bentófagos, iliófagos, detritívoros, onívoros, carnívoros e piscívoros. Em termos gerais, o trato digestório consiste em um esôfago, estômago e intestino. Além disso, dependendo do estado alimentar (trato vazio ou muito cheio), o intestino pode ser considerado pequeno, médio ou grande em tamanho. É importante destacar que nem todas as espécies têm estômago distinto e o comprimento do intestino pode variar amplamente (EAFP, 2020; MORAIS et al., 2009).

As gônadas são geralmente pares, localizadas em posição ventral à bexiga aérea. Sua aparência, tamanho e cor variam, dependendo das espécies, sexo e estado de desenvolvimento. Tamanho e cor são geralmente registrados para avaliar e observar o seu grau de desenvolvimento (imaturo, repouso, maturação inicial, maturação avançada, maturação madura e maturação repouso/vazio). Várias gônadas maduras (testículos) podem liberar facilmente espermatozoides (EAFP, 2020; MORAIS et al., 2009).

A bexiga natatória é o órgão responsável por auxiliar o processo de flutuação, é inflada com mistura de nitrogênio, oxigênio e gás carbônico. No entanto, existem espécies que não possuem a bexiga natatória (HICKMAN JÚNIOR; ROBERTS; LARSON, 2004). A bexiga aérea está localizada dorsalmente ao intestino e ligada ao esôfago e sua cor pode ser quase

transparente e delicada, ou na cor branca pérola sólida. A forma e consistência da parede da bexiga aérea variam muito entre as espécies (EAFP, 2020; MORAIS et al., 2009)

3 EXAME NECROSCÓPICO EM PEIXES

Necropsia refere-se ao conjunto de procedimentos e observações organizados, minuciosos e sequenciais de um cadáver, com o objetivo de identificar as alterações que resultaram em sua morte. Recomenda-se a execução do procedimento necroscópico completo, que inclui o exame cuidadoso de todos os órgãos para estabelecer, após estudo, a enfermidade principal, a *causa mortis* e os achados relacionados (MATOS et al., 2014).

Importante ressaltar que, antes de iniciar o exame necroscópico, faz-se necessário obter autorização do proprietário, bem como, seguir as exigências legais dos órgãos federais, estaduais e municipais responsáveis (PINTO et al., 2014). Deve-se avaliar as questões operativas e administrativas ligadas aos órgãos ambientais conforme Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981 (BRASIL, 1981).

A técnica de avaliação necroscópica descrita a seguir foi padronizada no Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, que tem como base as técnicas citadas pela Associação Europeia de Patologistas de Peixes (EAFP, 2020) e Morais et al. (2009).

3.1 DESCRIÇÃO DO HISTÓRICO, AMBIENTE E SINAIS CLÍNICOS

Para a realização do exame necroscópico é necessário que seja feita a identificação do animal a ser avaliado, a abordagem do histórico da criação, das condições do ambiente e dos sinais clínicos observados. Contudo, durante a investigação, devem ser obtidas todas as informações da rotina da propriedade e os fenômenos e observações que antecederam a morte dos animais avaliados. Além disso, deve-se obter informações sobre os sinais clínicos observados pelo proprietário, o tempo de evolução da doença, incluindo casos de mortes anteriores, condições de manejo, densidade populacional, comportamento dos animais, alimentação, oxigênio, pH, temperatura e transparência da água, aspectos de flora e fauna, topografia da área, tipo de solo, além de possíveis atividades agrícolas e/ou industriais na região (ALVES et al., 2010; BERTOLETTI, 1990; CETESB, 2011).

3.2 MATERIAIS E INSTRUMENTOS PARA A NECROPSIA E PROTEÇÃO INDIVIDUAL

Os materiais e instrumentos necessários para realizar a necropsia são: arco de serra manual, faca reta, faca curva, afiador de facas, tábua, pinças, tesouras, cabo de bisturi, lâminas de bisturi, etiqueta, caneta, formol 10% tamponado, frasco de vidro com ampla abertura, frasco coletor universal, lâminas de vidro, barbante, saco plástico, seringas descartáveis, agulhas, *swab* estéril descartável e tubos de ensaio com e sem anticoagulante (MATOS et al., 2014).

Além desse material, é necessária a paramentação adequada do profissional técnico com a utilização de equipamentos de proteção individual. Assim, recomenda-se prender cabelos longos, retirar relógio, anéis, correntes, adornos ou pulseiras e utilizar uniforme adequado como macacão, pijama ou avental cirúrgico, luvas de látex, botas de borracha, máscara e óculos de proteção (PINTO et al., 2014).

3.3 EUTANÁSIA

Os métodos de eutanásia são determinados pela Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018 que baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2018) e pela Resolução n°1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012).

Os métodos aceitáveis são: utilização de barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis, anestésicos inalatórios seguidos de outro procedimento para assegurar a morte, como a utilização de CO_2, tricaína metano sulfonato (TMS, MS222), hidrocloreto de benzocaína e 2-fenoxietanol. Os métodos aceitos sob restrição são decapitação e secção da medula espinhal (CFMV, 2012; CONCEA, 2018). Os principais métodos utilizados em peixes, sendo os mais conhecidos: golpe letal na cabeça, atordoamento elétrico, choque térmico com uso de gelo para insensibilização pré-abate, secção da medula seguida de sangria das brânquias e a morte por asfixia (FERREIRA et al., 2018).

É importante que sejam utilizadas as técnicas de eutanásia adequadas, para que haja insensibilização, evitando dor ou sofrimento durante o procedimento. Sabe-se que condições de estresse podem gerar reações químicas e influenciar diretamente na qualidade do produto e acelerar o *rigor mortis* (LINES et al., 2003).

3.3.1 Insensibilização

Na insensibilização dos peixes, convém usar anestésicos sintéticos como a tricaína (100 mg/L de água) e a benzocaína (1,0 ml/L de água) com o propósito de otimizar o manejo os quais são muito utilizados (INOVE et al., 2003). Outra possibilidade vantajosa que possui baixo custo, praticidade e eficiência é a utilização do óleo de cravo (100 mg/L de água), pois apresenta baixas concentrações e é de rápida metabolização e depuração no organismo do peixe (ICHO et al., 2000).

Para a realização da eutanásia, coloca-se o anestésico necessário em um recipiente graduado (tipo balde) de 10 litros de água, agita-se a solução vigorosamente e, em seguida, transfere-se o peixe imediatamente para o recipiente com anestésico. Quando o peixe chegar no estágio de anestesia profunda, apresentará comportamento de perda total de equilíbrio, em seguida o peixe será imerso em gelo (SIMÕES; PAIVA; GOMES, 2010).

3.3.2 Eutanásia por choque térmico (termonarcose)

A termonarcose é um dos métodos mais utilizados uma vez que promove diminuição metabólica por hipotermia, é feita de forma fácil, rápida, higiênica, além de minimizar possíveis danos à integridade da carne e promover o bem-estar dos animais. Essa técnica consiste na imersão do peixe em gelo por aproximadamente 60 minutos. A hipotermia gera insensibilização nos animais (ASHLEY, 2007; LAMBOOIJ et al., 2002).

3.4 EXAME EXTERNO

O exame externo essencialmente consiste da inspeção visual detalhada de todo o animal para avaliar sua condição geral, incluindo palpação do animal. Devem ser avaliadas as possíveis alterações, incluindo perda de peso ou obesidade, desvios da estrutura esquelética (escoliose, lordose), ausência, deformação ou atrofia de estruturas (anoftalmia, exoftalmia, coto da barbatana ou nadadeiras), distensão abdominal, inchaço ou crescimento anormal ou lesões evidentes, como furúnculos, úlceras, abscessos, hemorragias, escamas perdidas, pústulas, cistos, formações nodulares volumosas e alterações de coloração (EAFP, 2020).

Contudo, é importante considerar as adaptações e os aspectos morfométricos e taxonômicos diferenciados em cada espécie, observar e analisar as características do corpo do animal e obter os dados biométricos (FIGURA 2). Desta forma, são mensurados comprimento

total, comprimento furcífero, comprimento padrão, comprimento da cabeça, comprimento da maxila, distância pré-dorsal, altura do corpo, espaço interdorsal, comprimento da segunda nadadeira dorsal, distância pós-dorsal e o pedúnculo caudal. Além disto, são descritos os padrões de crescimento e alometria dentro das populações distintas, variando em forma, tamanho e a flexibilidade (BARLETTA; CORRÊA, 1992).

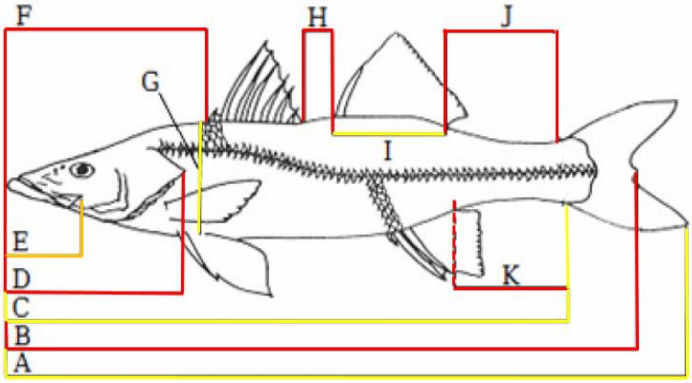

Figura 2 – Representação esquemática das dimensões do corpo de um peixe: (A) comprimento total; (B) comprimento furcífero; (C) comprimento padrão; (D) comprimento da cabeça; (E) comprimento da maxila; (F) distância pré-dorsal; (G) altura do corpo; (H) espaço interdorsal; (I) comprimento da segunda nadadeira dorsal; (J) distância pós-dorsal; (K) pedúnculo caudal.
Fonte: Adaptado de Barletta e Corrêa (1992).

Não obstante, na inspeção detalhada externa, devem ser analisadas outras estruturas, como opérculo, tegumento, barbatanas, barbilhos, olhos, narinas, boca, cavidade orofaríngea, região anal e urogênica da papila para permitir a microscopia de inspeção ou amostragem adicional. Uma observação importante a ser feita é que, caso haja necessidade de se coletar sangue durante a necropsia, o ideal é que essa coleta seja feita antes do exame externo, devido ao sangue do peixe coagular rapidamente (EAFP, 2020).

3.5 EXAME INTERNO

O exame interno inclui a avaliação dos órgãos e tecidos das cavidades abdominal, pericárdica e craniana, além da musculatura e o sistema esquelético (BLAZER et al., 2018).

3.5.1 Abertura do peixe

O animal deve ser posicionado em decúbito lateral direito. Inicialmente, introduz-se cuidadosamente a ponta da tesoura romba na papila urogenital e realiza-se corte ao longo da

linha ventral em direção até o término da boca para a abertura da cavidade abdominal. Em seguida, faz-se inspeção detalhada e, caso haja presença de líquido, o mesmo deverá ser analisado quanto ao aspecto e coloração, coletado e mensurado (BLAZER, 2000).

Com o auxílio de uma faca, faz-se corte na extremidade do comprimento padrão do decúbito esquerdo e, após essa etapa, fazer outro corte lateralmente à cauda, seguindo a espinha dorsal até a lateral do comprimento da cabeça, chegando ao opérculo. Depois, deve ser removido o retalho da musculatura (EAFP, 2020).

Com o auxílio de pinça dentada, levanta-se o opérculo cuidadosamente, e com uma tesoura secciona-se a parede do corpo. Assim, será possível observação topográfica dos órgãos internos e também coleta de material, especialmente para exame microbiológico, ao qual deve ser realizado o mais breve possível, com a finalidade de minimizar possíveis contaminações (YANONG, 2003).

3.5.2 Exame de narinas, boca e cavidade orofaríngea

As narinas são examinadas rotineiramente principalmente para observações de possíveis alterações e para a coleta de exsudatos (BEMVENUTI; FISCHER, 2010).

A boca deverá ser aberta para observação macroscópica. Dependendo do posicionamento da boca (superior, terminal, inferior ou subterminal), o tamanho, o formato e os tipos de dentes poderão trazer dados importantes sobre os hábitos alimentares e a possível forma de captura do alimento (BLAZER et al., 2018).

Durante este exame, deve-se avaliar a existência de hemorragias, erosões, massas, parasitos, deformações estruturais ou mandibulares que impeçam o fechamento eficaz da boca. Bolhas de ar que afetam a língua e o palato também podem ser observadas, como resultado de uma saturação excessiva de gás (EAFP, 2020).

3.5.3 Exame de brânquias

Deve-se observar minuciosamente a cavidade que envolve as brânquias, rastros branquiais, filamentos branquiais, lamelas branquiais e o arco branquial, para se determinar alterações e também o estado de conservação do cadáver. É importante observar as alterações de cor (palidez ou escurecimento), hemorragia, secreção excessiva de muco ou presença de parasitos, dentre outras. Destaca-se ainda que, no animal fresco, ou seja, imediatamente após a

eutanásia, as brânquias são vermelhas e brilhantes e não possuem excesso de muco ou parecem pálidas e desidratadas (BLAZER et al., 2018).

3.5.4 Exame de cavidade pericárdica e coração

A cavidade pericárdica é consideravelmente menor que a cavidade abdominal e, durante a avaliação macroscópica, devem ser observados possíveis acúmulos de conteúdo, coágulos sanguíneos, exsudatos ou parasitos (EAFP, 2020).

As diferentes câmaras do coração possuem colorações e consistências diferentes, portanto, deve-se verificar e registrar anormalidades também em posição, tamanho, brilho e coloração (BLAZER et al., 2018).

3.5.5 Exame da vesícula biliar, fígado e baço

A vesícula biliar e o conteúdo devem ser analisados antes do fígado e a abertura da vesícula deve ser feita com auxílio de tesoura. É importante o exame deste órgão inicialmente para evitar que a bile extravase e danifique outros tecidos. Em seguida, o fígado é analisado com o auxílio de faca reta. As cores deste órgão podem variar amplamente, tanto entre espécies, sexo, alimentação, estado reprodutivo e devido a doenças (EAFP, 2020).

O exame do baço é realizado com a avaliação da superfície que normalmente é lisa e com bordas bem definidas. Quaisquer alterações do tamanho, forma ou coloração são importantes e devem ser relatadas. Quando há estômago, o baço é encontrado em sua curvatura caudal (BLAZER et al., 2018).

3.5.6 Exame do trato digestório

A abertura do trato digestório deve ser feita com auxílio de tesoura ponta romba e a parede, incluindo mucosa, e o conteúdo deverão ser avaliados quanto à presença de hemorragias, sinais de inflamação, parasitos, nódulos ou corpos estranhos (EAFP, 2020).

3.5.7 Exame das gônadas, bexiga e rim

Com o auxílio de tesoura, removem-se gônadas, bexiga e rins. Esses órgãos são avaliados quanto à presença de possíveis alterações macroscópicas que frequentemente afetam

a parte posterior (excretora), incluindo aumento de volume, espessamento, perda de brilho, vesículas, nódulos ou lesões granulomatosas. Deve-se ainda verificar a presença de parasitos e exsudatos, hemorragias ou hiperemia, dentre outras (BLAZER et al., 2018; YANONG, 2003).

3.5.8 Exame da cavidade craniana e cérebro

Para acessar a cavidade craniana e o cérebro, o crânio precisa ser aberto com o auxílio do arco de serra manual. A secção é feita no sentido transversal para exposição do cérebro. Tanto a cavidade craniana quanto o cérebro são analisados. São avaliados a aparência geral, cor e consistência, presença de líquidos, hemorragias, bem como, a eventual presença de parasitos (EAFP, 2020).

3.5.9 Exame da musculatura e ossos

A musculatura deverá ser avaliada por meio de cortes transversais paralelos com o auxílio de faca ou bisturi. São analisadas consistência, coloração, presença de estruturas nodulares, hemorragias, abscessos, cistos, parasitos, dentre outras. Quanto a avaliação dos ossos, deve ser dada atenção especial a possíveis alterações como desvios da estrutura esquelética (escoliose, lordose), ausência, consistência, deformação ou atrofia de estruturas (BLAZER et al., 2018).

4 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E ENVIO DE AMOSTRAS

Durante a necropsia é importante que sejam coletadas amostras para exames complementares, quando necessário. Para isto é imprescindível a coleta de amostra adequada, em termos de tamanho e preservação do tecido, bem como assegurar o correto acondicionamento e envio de amostras. Além disso, é importante atentar para o preenchimento correto da ficha de requisição laboratorial e identificação adequada com os dados do animal, número de necropsia e nome do material coletado (MATOS et al., 2014).

4.1 EXAME DE SANGUE

A coleta de sangue, pode ser feita de três maneiras: a) pelo parênquima do rim cranial (a partir da cavidade opercular, ao último arco branquial); b) por punção venosa da veia caudal

(venopunção de vasos localizados na região caudal, sem ocasionar muitas lesões no animal); c) punção intracardíaca (sentido cranial para localizar o coração) (NOGA et al., 1988).

Para a coleta, utiliza-se agulha 22 G acoplada a seringa de 1 mL descartável e puncionase aproximadamente 0,2 mL de sangue. Em seguida, transfere-se o sangue para microtubo de 1,5 mL com anticoagulante de forma lenta para não causar turbilhonamento do mesmo (ALTINOK et al., 2001).

O sangue, deve ser armazenado sob refrigeração (entre 5 ºC a 7 ºC) desde os primeiros momentos e, para isso, é importante estar ao alcance do operador uma caixa de isopor ou caixa térmica com gelo ou similares. Além disso, recomenda-se levar as amostras ao laboratório em até 12 horas após a colheita (ISHIKAWA et al., 2010).

4.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO

As amostras de tecidos e órgãos que forem designados para avaliação histopatológica devem ser fixadas em formalina a 10% tamponada, colocadas em frascos de boca larga e com boa vedação e mantidos em temperatura ambiente. As amostras devem ser fixadas o mais rápido possível para impedir o processo de autólise (MATOS et al., 2014).

4.3 EXAME PARASITOLÓGICO

Para fazer a coleta de parasitos em peixes, é necessário que se garanta a boa conservação dos parasitos para que possa ser feita a correta identificação dos mesmos (SANTOS et al., 2013).

A coleta de parasitos na pele, requer a raspagem do tecido no sentido cabeça cauda (rabo), incluindo as nadadeiras. Após a raspagem o material é depositado em placa de Petri para que haja a recuperação dos parasitos. Nas narinas, as mesmas devem ser abertas com auxílio de uma tesoura de ponta fina e realizar a lavagem das suas cavidades nasais com soro fisiológico a 0,65% ou formol 10%. Em brânquias ou guelras, a coleta deve ser feita após a retirada cuidadosa desses órgãos e, em seguida, separar cada parte das brânquias (chamada de arco branquial). Nos olhos, deve ser realizada com auxílio de instrumento ponteagudo para a remoção destes órgãos e, em seguida, estes devem ser rompidos dentro de um frasco com abertura ampla ou placa de Petri. Em órgãos internos, é necessário observar se há algum parasito aderido na superfície ou na própria cavidade abdominal e, posteriormente coletá-los para avaliação detalhada (JERÔNIMO et al., 2012).

De maneira geral, todos os parasitos devem ser coletados íntegros e colocados inicialmente em placas de Petri contendo soro fisiológico e separados com relação ao local encontrado e também à aparência (achatado, redondo ou segmentado). Posteriormente, devem ser fixados. Para isso, os nematoides inviáveis precisam ser imersos em fixador frio (AFA - 93% álcool, 70% GL, 5% formol comercial e 2% ácido acético) e os nematoides viáveis são colocados inicialmente em solução salina fisiológica e depois em frascos contendo fixador AFA aquecido (65ºC) por 48 horas. Outros parasitos como cestódeos e trematódeos necessitam ser colocados entre duas lâminas de microscopia amarradas com fio de algodão e posteriormente colocadas em frascos contendo fixador AFA frio por 48 horas (MONTEIRO, 2010).

Os frascos devem ser bem vedados, identificados e enviados para avaliação dos espécimes parasitários juntamente com a requisição do exame (MATOS et al., 2014).

4.4 EXAME TÓXICOLÓGICO

Para o exame tóxicológico a fim de detectar agrotóxicos ou outras substâncias tóxicas, o peixe deve ser embrulhado em papel alumínio (com o lado fosco virado para dentro), colocado em saco plástico limpo, identificado e congelado o mais rápido possível. Tecidos em geral (como por exemplo, cérebro, fígado, brânquias ou sangue), que são necessários para análises especiais, devem ser separados, colocados individualmente em sacos plásticos limpos, identificados e congelados Para análises de metais e outros elementos, as amostras também devem ser coletadas separadamente e armazenadas da mesma forma citada anteriormente (MEYER; BARCLAY, 2009).

Independentemente do tipo de material coletado, os mesmos devem ser enviados para exame tóxicológico juntamente com formulário de requisição contendo todos os dados necessários para o entendimento, como dados dos animais, bem como histórico e achados anatomopatológicos, semelhante aos demais exames (MATOS et al., 2014).

4.5 EXAMES MICROBIOLÓGICOS

Para a realização de exame microbiológico, o material deve ser coletado utilizando *swab* estéril e este deve ser colocado em contato com a secreção, órgão ou lesão levemente rotacionado até que toda a sua superfície seja preenchida com material. Além disso, pode-se retirar, de forma asséptica, um fragmento do órgão ou tecido acometido e colocá-los em frasco estéril e refrigerá-los antes de encaminhar ao laboratório para análise (KLESIUS et al., 2000).

É importante frisar que o diagnóstico de doenças bacterianas deve ser realizado, preferencialmente, a partir de amostras de peixes vivos ou mortos recentemente (FIGUEIREDO; LEITE, 1996).

As amostras para cultivo bacteriano nunca devem ser congeladas, pois o congelamento pode ocasionar a inativação dos microrganismos e consequentemente originar resultados falsos negativos (FUJIMOTO et al., 2015).

Independentemente do tipo de material coletado, todos devem ser enviados ao laboratório acompanhados de um formulário de solicitação de exame microbiológico contendo o tipo de material coletado, data da coleta, dados do animal, histórico e suspeita clínica. Importante salientar que todas as amostras devem ser encaminhadas ao laboratórios em caixas de isopor com gelo e também precisam ser embaladas individualmente em sacos plásticos para que não ocorra a entrada de água. A tampa da caixa precisa ser bem fechada e conter identificação do remetente e do animal (FIGUEIREDO; LEITE, 1996).

5 ELABORAÇÃO DO RELATÓRIO DE NECROPSIA

O relatório de necropsia deve conter todas as informações detalhadas dos achados observados durante a realização do exame necroscópico, bem como os resultados de exames complementares (MATOS et al., 2014).

As informações que devem estar presentes no relatório de necropsia de peixes são as seguintes: cabeçalho contendo todas as informações do animal necropsiado e do proprietário/responsável, histórico clínico, alterações macroscópicas observadas durante a realização do exame externo e do exame interno com detalhamento de cada órgão acometido, alterações microscópicas (quando realizadas), conclusão da necropsia, *causa mortis* e assinatura e identificação do patologista responsável pelo exame necroscópico (MEYER; BARCLAY, 2009).

6 PRINCIPAIS LESÕES ENCONTRADAS EM PEIXES UTILIZADAS COMO INDICADORES DE SAÚDE AMBIENTAL

As Tabelas 1, 2 e 3 demonstram respectivamente agentes tóxicos, bacterianos e fúngicos que podem causar lesões em peixes e consequentemente serem usados como indicadores de saúde ambiental.

Tabela 1 – Lesões observadas em peixes e sua associação com os agentes tóxicos.

Lesões	Agente tóxico
Obstrução das brânquias	Turbidez e hidróxido férrico
Brânquias vermelhas e brilhantes	Cianeto
Brânquias escuras	Fenol, nitrito, sulfeto de hidrogênio, baixa de oxigênio
Película fina e branca nas brânquias, pele e boca	Ácido, metais pesados, trinitrofenol
Epitélio das brânquias enlameadas	Cobre, zinco, amônia, detergente, chumbo e plantas tóxicas
Hemorragia nas brânquias	Detergentes
Estômago azul	Molibdênio
Nadadeira peitoral virada em posição para frente	Organofosforados, carbamatos
Bolhas de gás na nadadeiras, olhos e pele	Supersaturação de gases

Fonte: Adaptado de Meyer e Barclay (2009).

Tabela 2 – Lesões observadas em peixes e sua associação com agentes bacterianos e com as alterações de temperatura do ambiente.

Lesões	Agente bacteriano	Temperatura ambiente
Hemorragias pelo corpo, brânquias, nadadeiras e órgãos internos, intestino (presença de fluido amarelado ou sanguinolento)	*Pseudomonas fluorescens*	Temperatura elevada
Lesões de coloração acinzentada nas nadadeiras e no corpo do animal	*Flexibacter columnaris*	Temperatura elevada
Hemorragias pelo corpo, áreas hiperêmicas nas nadadeiras e órgãos internos	*Aeromonas hydrophila*	Temperatura elevada
Hemorragias pelo corpo, brânquias, nadadeiras e órgãos internos, intestino (presença de fluido amarelado ou sanguinolento)	*Streptococcus agalactiae*	Temperatura elevada
Hemorragias	*Edwardsiella tarda*	Temperatura elevada

Fonte: Adaptado de Meyer e Barclay (2009).

Tabela 3 - Agentes fúngicos que se manifestam em peixes pelo uso de alimentações inadequadas, acompanhadas de injúrias físicas.

Lesões	Agentes fúngicos	Fatores presdisponentes
Abscessos, úlceras e lesões induzidas por parasitas. Podem ocorrer nos ovos, larvas, alevinos e em peixes adultos.	*Saprolegnia parasitica*	Qualidade inadequada da água e suas condições ambientais.
Pele com aspecto áspero e órgãos de coloração cinza.	*Ichthyophonus hoferi*	Qualidade inadequada da água e suas condições ambientais.

Fonte: Adaptado de Meyer e Barclay (2009).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os peixes representam a classe de organismos aquáticos com grande importância como indicadores da saúde ambiental, assim, o conhecimento sobre a forma adequada de proceder ao exame pós-morte nestes indivíduos necessita ser maior difundido. O exame necroscópico em peixes é imprescindível para o estabelecimento do diagnóstico das doenças e da identificação dos agentes etiológicos. Outrossim, a correta coleta de amostras para a realização dos exames complementares também é fator determinante para a precisão diagnóstica.

8 REFERÊNCIAS

ALTINOK, I. et al. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, Germany, v. 44, n. 1, p. 29-34, 2001.

ALVES, C. B. M. et al. Aspectos da conservação da fauna de peixes da bacia do rio São Francisco em Minas Gerais. **MG BIOTA**, Belo Horizonte, v. 2, n. 6, 2010.

ASHLEY, P. J. Fish welfare: current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 104, n. 3-4, p. 199-235, 2007.

BARLETTA, M.; CORRÊA, M. F. M. **Guia para identificação de peixes da costa do Brasil**. Curitiba: UFPR, 1992.

BEMVENUTI, A. B. M.; FISCHER, L. G. Peixes: morfologia e adaptações. **Cadernos de Ecologia Aquática**, Rio Grande, v. 5, n. 2, p. 31-54, 2010.

BERTOLETTI, E. **Ensaios biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição**. São Paulo: CETESB, 1990.

BLAZER, V. S. et al. Necropsy-based wild fish health assessment. **Journal of Visualized Experiments**, Boston, n. 139, p. e57946, 2018.

BLAZER, V. S. **The necropsy-based fish health assessment**. Biomoni toring of environmental status and trends (BEST) program: selected methods for monitoring chemical con taminants and their effects in aquatic ecosystems. Columbia: Information and Technology Report USGS/BRD-2000-0005, 2000.

BONE, Q.; MARSHALL, N. B. **Biology of fishes**. London: Blackie, 1982.

BOTKIN, D. B.; KELLER, E. A. **Environmental science:** earth as a living planet. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.

BRASIL. **Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981.** Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. 1981. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1980-1987/lei-6938-31-agosto-1981-366135-publicacaooriginal-1-pl.html>. Acesso em: 17 jun. 2020.

CETESB, A. **Guia Nacional de coleta e preservação de amostras**: água, sedimentos, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB, 2011.

CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária). **Guia brasileiro de boas práticas para a eutanásia em animais**: conceitos e procedimentos. Brasília: CFMV, 2012.

CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). **Diretriz da prática de eutanásia do conselho nacional de controle de experimentação animal**. Resolução Normativa CONCEA nº 37/2018. 2018. Disponível em: <http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_37_de_15022018.html>. Acesso em: 17 jun. 2018.

EAFP (*European Association of Fish Pathologists*). **Necropsy manual**. 2020. Disponível em: <www.necropsymanual.net>. Acesso em: 17 jun. 2020.

FERREIRA, A. N. de. et al. Boas práticas no pré-abate e abate de pescado. **Pubvet**, Maringá, v. 12, p. 138, 2018.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEITE, R. C. Colheita e remessa de material para exame bacteriológico. In: NUNES, I. J. **Cadernos técnicos da escola de veterinária da UFMG**. Belo Horizonte: Centro de Extensão - CENEx, 1996. p. 59-75.

FISCHER, P.; BRITO, L.A.B. **Técnica de necropsia**. Publicação de circulação interna (apostila): Departamento de Patologia da Escola de Veterinária da UFG, 1989.

FUJIMOTO, R. Y. et al. **Procedimentos analíticos para avaliação de doenças de peixes**. 1. ed. Aracaju: EMBRAPA, 2015.

HICKMAN JÚNIOR, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

ICHO, G. K. et al. Comparison di-tricaine methanesulp"'onate (MS222) and clave ail anaesthesia effects on the phvsiology af juvenile *Chinook salmon, Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 537-546, 2000.

INOVE, L. A. K. A. et al. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxá *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5. p. 943-947, 2003.

ISHIKAWA, M. M. et al. **Procedimentos básicos para colheita de sangue em peixes**. 1. ed. Dourados: EMBRAPA, 2010.

JERÔNIMO, G. T. et al. **Coleta de parasitos em peixes de cultivo**. 1. ed. Macapá: EMBRAPA, 2012.

KLESIUS, P. H. et al. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdan, v. 188, n. 3-4, p. 237-246, 2000.

LAMBOOIJ, E. et al. A feasible method for humane slaughter of eel (*Anguilla anguilla* L.): electrical stunning in freshwater prior to gutting. **Aquaculture Research**, England, v. 33, n. 9, p. 643-652, 2002.

LINES, J. A. et al. Electric stunning: a humane slaughter method for trout. **Aquacultural Engineering**, London, v. 28, n. 3-4, p. 141-154, 2003.

LINEY, K. E. et al. Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 114, n. suppl 1, p. 81-89, 2006.

MATOS, M. P. C. et al. **Manual de necropsia, colheita e envio de amostras para diagnóstico laboratorial de enfermidades de bovinos**. Goiânia: Zoetis, 2014.

MEYER, F. M.; BARCLAY, L. A. **Manual de campo para investigação de morte de peixes**. Belo Horizonte: Cemig, 2009.

MONTEIRO, S. G. Técnicas laboratoriais. In: _____. **Parasitologia na medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. p. 301-312.

MORAIS, A. M. et al. A fauna de parasitos em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae: 45 Serrasalminae) criados em tanques-rede em lago de várzea da Amazônia central. **Biologia Geral e Experimental**, Boa Vista, v. 43, n. 1, p. 105-111, 2009.

NOGA, E. J. et al. Kidney biopsy: a nonlethal method for diagnosing *Yersinia ruckeri* infection (enteric redmouth disease) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, n. 3, p. 363-365, 1988.

PASCKE, M. S.; LANZENDORF, F. N. Diferença entre peixes de água salgada e peixes de água doce. **Maiêutica - Ciências Naturais**, Santa Catarina, v. 5, n. 1, p. 57-68, 2017.

PENTTINEN, R. et al. High nutrient concentration can induce virulence factor expression and cause higher virulence in an environmentally transmitted pathogen. **Microbial Ecology**, Oslo, v. 72, n. 4, p. 955-964, 2016.

PINTO, N. C. et al. **Manual de orientação para procedimentos durante o atendimento à emergência ambiental envolvendo mortandade de peixes**. Minas Gerais: Sistema Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos, 2014.

RASHED, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International**, Elmsford, v. 27, n. 1, p. 27-33, 2001.

SANTOS, E. F. et al. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no estado do Amapá, Amazônia oriental. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 43, n. 1, p. 105-111, 2013.

SILVA, E. et al. Something from "nothing"− eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 36, n. 8, p. 1751-1756, 2002.

SIMÕES, L. N; PAIVA, G.; GOMES, L. C. Óleo de cravo como anestésico em adultos de tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 12, p. 1472-1477, 2010.

WERNERSSON, A. S. et al. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. **Environmental Sciences Europe**, Berlin, v. 27, n. 7, p. 1-11, 2015.

YANONG, R. P. E. Necropsy techniques for fish. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, New York, v. 12, n. 2, p. 89-105, 2003.

Imunonutrientes em avicultura de postura

Mayara Correa Dias de Souza[1]
Jose Geraldo de Vargas Junior[2]

[1] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: mayaracorreadias@gmail.com
[2] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: jose.vargas@ufes.br

1 INTRODUÇÃO

A avicultura de postura é um dos setores mais desenvolvidos do agronegócio brasileiro, devido seu alto desempenho, tecnologia empregada nas instalações e equipamentos, nutrição e sanidade muito avançada, contribuindo assim para o desenvolvimento da economia do Brasil. Porém, com o crescente aumento do potencial produtivo das aves, uma série de problemas metabólicos e de manejo tem surgido, destacando-se o baixo potencial imunitário das aves e maior susceptibilidade aos fatores ambientais como alta temperatura e umidade (LEMOS et al., 2016).

Dentre os novos caminhos que devem ser encontrados na nutrição animal, a melhoria na produtividade dos animais deve estar em sincronia com o bem estar e a capacidade imunitária. Assim, vem se tornando cada vez mais importante a imunonutrição, que pode ser entendida como a capacidade de aumentar a resistência do organismo a doenças utilizando-se nutrientes imunomoduladores (CARDOSO; TESSARI, 2015).

Macro e micro nutrientes são identificados como aditivos com ação imunomoduladora. Sistemas de produção altamente intensivos os animais são constantemente desafiados a microorganismos patogênicos, contudo esses patogenia são debelados pelo sistema imune, com raras manifestações clinica, porem esses custo é apresentado em menor desempenho zootécnicos dos animais. Isso ocorre por que os nutrientes que seria direcionados para os desempenho animais foram desviados direcionados para auxiliar o sistema imune do hospedeiro contra o agente patogênico (SOUZA et al., 2020).

Segundo Penz Junior (2019), a sustentabilidade se traduz na eficiência com que os animais são produzidos, de maneira que, as aves criadas em condições adequadas, expressam suas potencialidades genéticas e com menor variabilidade. Diante deste contexto, faz-se necessária uma análise bibliográfica, explanando os resultados obtidos por diversos autores sobre os efeitos e perspectivas do uso de substratos imunomodulatórios sobre o sistema imune na avicultura de postura.

2 SISTEMA IMUNE

O sistema imunológico é uma rede complexa e sofisticada de tecidos, órgãos, células, proteínas e produtos químicos especializados em proteger o hospedeiro de variedades de agentes patogênicos, tais como: bactérias,vírus, fungos e parasitas. Visto que a sua funcionalidade é algo altamente dependente da interação entre diversos outros sistemas,

envolvendo diferentes células, receptores e mediadores químicos. Variações interindividuais em muitas funções imunológicas existem dentro do rebanho saudável e são devidas à idade, genética, instalações, dieta, estresse, entre outras. Além disso, mudanças sazonais e de temperatura e estar em superlotações (SILVA et al., 2013).

O sistema linfoide constitue duas amplas categorias estruturais do sistema imunológico das aves. Entre os componentes linfoide, a bursa de Fabrícius e o Timo, sítio de desenvolvimento e diferenciação de linfócitos B e T, respectivamente, são considerados órgãos linfoides primários. Enquanto o baço e o tecido linfoide associado a mucosa (glândula de Hard, intestino, brônquios, placa de Meyer, divertículo de Meckel, tonsilas fecais e pineal) são considerados órgãos linfoides secundários (CARDOSO; TRESSARI, 2015).

As células imunes, como outros tipos de células, precisam ser alimentadas: elas requerem suprimento adequado de energia e nutrientes como fatores no desenvolvimento, manutenção e expressão da resposta imune. Sabendo que o estado nutricional do animal modula a imunidade, a imunocompetência é considerada como medida nutricional adequada. No entanto, estudos têm mostrado que níveis considerados ótimos para o crescimento e ganho de peso podem não ser suficientes para resposta imune adequada (TREVISOL, 2008).

Em galinhas, o sistema imunológico inato são macrófagos, heterófilos e linfócitos do tipo B1 que produzem anticorpos naturais. Esse sistema é regulado por citocinas pró-inflamatórias produzidas principalmente por macrófagos e neutrófilos, como IL-1, TNF-α, IL-6 e IL-12, além de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, que diminuem a inflamação, uma vez eliminados os patógenos (BOODHOO et al., 2016).

A imunidade específica ou adaptativa depende do reconhecimento do antígeno, pelo anticorpo ou células T. As células apresentadoras de antígeno (APC`s), capturam o antígeno no local da infecção, processam-no e exibem o antígeno processado em suas superfícies usando moléculas de histocompatibilidade classe II. Quando as APCs chegam a um linfonodo regional, elas expõem células T ingênuas ao antígeno e iniciam a proliferação e maturação, tendo resposta mais rápida na exposição subsequente ao mesmo antígeno (STEPHENSEN, 2001).

3 NUTRIENTES IMUNOMODULADORES

3.1 VITAMINAS

As vitaminas que mais atuam como imunomoduladores são as vitaminas A, D, E e C, que propiciam melhoria da resistência a infecções nos animais. Participam também como

cofatores de reações metabólicas por permitir melhoria da eficiência dos sistemas no organismo animal. Independentemente dos fatores do ambiente, a maioria dos organismos animais são incapazes de sintetizar todas as vitaminas das quais necessitam, por isso há necessidade de serem incluídas na dieta. As quantidades variam em função da idade, sexo, estado fisiológico e atividade física do indivíduo e em períodos de crescimento, ovulação e postura, nas condições de trabalho intenso e ocorrência de determinadas doenças, notadamente as infecciosas podem aumentar as exigências nutricionais (BIASEBETTI; RODRIGUES; MAZUR, 2018).

3.1.1 Vitamina A

A vitamina A é um antioxidante muito eficaz e pode retardar o processo de peroxidação lipídica (EL-SENOUSEY et al., 2018), é essencial para a integridade do tecido epitelial, o que representa grande defesa contra a entrada de patógenos e também esta relacionada ao funcionamento das glândulas adrenais para produção de corticosteroides necessários para prevenção de doenças (MUBILA et al., 2018).

A deficiência de vitamina A prejudica a imunidade inata, impedindo a regeneração normal das barreiras das mucosas danificadas pela infecção e diminuindo a função de neutrófilos, macrófagos e células natural killer. A vitamina A também é necessária para imunidade adaptativa e desempenha papel no desenvolvimento de células T auxiliares (Th) e células B. Em particular, a deficiência de vitamina A diminui as respostas mediadas por anticorpos direcionadas pelas células Th2, embora alguns aspectos da imunidade mediada por Th1 também estejam diminuídos (SIRISINHA, 2015; STEPHENSEN, 2001).

Mubila et al. (2018) observaram que a suplementação de 10.000 UI/kg de vitamina A no dia da vacinação contra o vírus da doença de Newcatle aumentou o título de anticorpos após a vacinação nas galinhas. No experimento, foi recomendado o uso de 10.000 UI de vitamina A, podendo chegar a 20.000 UI.

A suplementação dietética de vitamina A acima das recomendações pode aumentar a conteúdo desta vitamina nos ovos e restaura, também, a atividade normal de órgãos reprodutores em galinhas poedeiras criadas em temperatura ambiente mais alta. Este aumento do teor de vitamina A em ovos enriquecidos com ácido graxo poliinsaturado também podem reduzir a deterioração da qualidade dos ovos devido à peroxidação lipídica do ácido graxo poliinsaturado durante o armazenamento (AHMAD et al., 2019).

As infecções comuns podem aumentar o risco de deficiência da vitamina A diminuindo a ingestão, diminuindo a absorção e aumentando a excreção. A deficiência de vitamina A, por

sua vez, prejudica a resposta imune inata e adaptativa à infecção. Em particular, a integridade da mucosa e as respostas mediadas por Th2 estão comprometidas (STEPHENSEN, 2001).

Apesar da vitamina A ter sido denominada "a vitamina anti-infecciosa", essa descrição não foi totalmente precisa, pois trabalhos mais recentes mostraram que a vitamina A atua mais para melhorar a recuperação da infecção do que para prevenir a infecção em primeiro lugar (LARANGE; CHEROUTRE, 2016).

3.1.2 Vitamina D

A vitamina D (calciferol) é lipossolúvel, fornecida pela dieta ou produzida na irradiação do 7-desidrocolesterol pela luz ultravioleta e passando por uma série de hidroxilações no figado e rins transformando-a na sua forma hormonal, o calciferol biologicamente ativo, sendo armazenado em tecidos. Esse hormônio pleiotrópico exerce uma variedade de efeitos biológico (RODRIGUEZ-LECOMPTE et al., 2016), incluindo papel importante no desenvolvimento de células da pele e células sanguíneas e no controle da atividade das células imunes. Em que são mediadas por seus metabólitos e sua função é manter a homeostase do cálcio e fósforo, regulando a absorção intestinal desses nutrientes e, portanto, essencial para a formação e reabsorção óssea (VAZQUEZ et al., 2018). A presença de receptores da vitamina D nas células do sistema imunológico, os monólitos ou macrófagos e células linfoides, indicam papéis importantes na modulação da resposta imune, diferenciação e proliferação celular (RUTZ et al., 2002).

Vazquez et al. (2018) relatam que a adição de vitamina D3 nas dietas de frangos de corte em níveis de até 25 vezes (5.000 UI / kg), recomendado pelo NRC (1994) (200 UI / kg), melhorou a modulação da resposta imune, podendo relacionar essa melhora ao metabolito 1,25 (OH) D3, que é conhecido por estimular a hematopoiese quando ligado à vitamina D3 localizado nas membranas das células hematopoiéticas, como os linfócitos B e T. Observa-se ainda que o nível de vitamina D recomendado pelo NRC (1994) destina-se apenas a evitar a deficiência de vitaminas.

Rodriguez-Lecompte et al. (2016) afirmam que a suplementação de 2.760 UI/ kg de vitamina D induziu o aumento da expressão de citocinas pro e antiinflamatórias, porém a expressão de citocinas antiinflamatórias IL-10 e da citocina TH2 IL-4 foram muito maiores do que os das citocinas pro-inflamatórias. Além disso, os efeitos mais profundos da suplementação com vitamina D3 foram observados no tecido do baço de aves alimentadas com dieta baixa em Ca / P. Em galinhas, o baço atua como reservatório e local de ativação dos leucócitos e,

portanto, a expressão gênica esplênica reflete a função imune sistêmica. Nessas circunstâncias, a suplementação de vitamina D resultará na indução da proteína de ligação ao Ca no intestino e aumentará a absorção e retenção de cálcio. Os níveis de expressão de TLR2b e TLR4 aumentados simultaneamente refletem status sensorial aumentado do sistema imunológico inato e podem, em parte, ter a ver com uma tentativa de manter o equilíbrio imunológico.

3.1.3 Vitamina E

Constituída de glicoproteínas a vitamina E é lipossolúvel e normalmente armazenada a nível de membrana, entre os fosfolipídeos, exercendo função antioxidante. Atua juntamente com a vitamina C e a glutationa dependente de selênio (RUTZ et al., 2002). Tem além disso, função de proteção de linfócitos, macrófagos e células plasmáticas contra danos oxidativos, melhorando as funções e proliferações das células imunes (ATTIA et al., 2016).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas na célula como resultado do metabolismo e desempenham papéis importantes em muitos processos fisiológicos do corpo, incluindo imunomodulação, sinalização celular, regulação de citocinas, hormônio, transcrição, apoptose, íons transporte e neuromodulação. Há um equilíbrio redox dinâmico nas células entre as moléculas antioxidante e oxidante e uma perturbação no equilíbrio redox leva ao estresse oxidativo que é prejudicial para as células. O sistema de defesa antioxidante intervém para evitar que o estresse oxidativo possa prejudicar o corpo (ATTIA et al., 2016).

A vitamina E tem efeito imunorregulador, que pode operar através da modulação das vias da ciclooxigenase e lipoxigenase, resultando no controle da síntese de substâncias como prostaglandinas e leucotrienos (POMPEU; CAVALCANTI; TORAL, 2018). As prostaglandinas possuem ação imunosupressoras, enquanto que os leucotrienos estimulam o sistema imunológico. Tendo os macrófagos como célula responsável pela produção de prostaglandinas, a vitamina E apresenta papel importante na redução da produção de prostaglandinas ao antagonizar a peroxidação do ácido araquidônico, limitando a entrada de precursores na via das prostaglandinas (RUTZ et al., 2002) e a redução das concentrações plasmáticas de corticosterona (POMPEU; CAVALCANTI; TORAL, 2018).

Liu et al. (2019) observaram que suplementação dietética de 30UI / kg de vitamina E pode aliviar os sintomas de estresse causados pelo desafio da *Salmonella Enteritidis* e pode ser usada como intervenção dietética para o controle da infecção por *Salmonella* em galinhas poedeiras, melhorando assim a saúde das aves e o desempenho da produção.

Ebrahimzadeh et al. (2018) obtiveram melhoras nos títulos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle aos 42 dias, em frangos de corte alimentados com dieta contendo 200 mg de acetato de tocoferol / kg, quando comparados ao grupo sem suplementação. Darabighane et al. (2017) também relataram aumento dos títulos de anticorpos contra o glóbulos vermelhos de ovinos e títulos de anticorpos contra vírus de Newcastle, porém, usando 100 mg de acetato de tocoferol alfa / kg frangos de corte.

3.1.4 Vitamina C

O ácido ascórbico é antioxidante solúvel em água, e incluído nas dietas para proteger os ingredientes da degradação e deterioração durante o armazenamento da ração e para fins nutricionais. O ácido ascórbico desempenha papel essencial na prevenção de várias doenças por ter capacidade de doar elétrons para proteger o hospedeiro do estresse oxidativo. A suplementação com ácido ascórbico mostra efeito positivo na redução do estresse fisiológico causado pela rápida taxa de crescimento e pelas condições ambientais da produção avícola (HERNANDEZ-PLATAN et al., 2019).

O ácido ascórbico atua como cofator para várias enzimas envolvidas na biossíntese do colágeno, carnitina, neurotransmissores, biossíntese da secreção de adrenalina, regulação da temperatura corporal, aumento da imunidade e estão altamente concentrados nos neutrófilos (ATTIA et al., 2016). A vitamina C também está envolvida e tem papel importante na biossíntese de corticosterona, hormônio glicocorticóide primário, envolvido na gliconeogênese para melhorar o suprimento de energia durante o estresse. Assim como aumentando a produção de interferon, potencializando a imunidade (SHARMA et al., 2019).

El-Senousey et al. (2018) mostraram que a injeção in ovo de 3mg/ovo de ácido ascórbico reduziu os níveis de expressão de genes relacionados ao sistema imunológico, o que pode estar associado à capacidade antioxidante para eliminar a produção excessiva de espécie reativa a oxigênio (ERO), levando à supressão das citocinas pró-inflamatórias: glutona peroxidase (GSH-PX), super peróxido desmutase (SOD), interleucina (IL-1β, IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF-α).

3.2 MINERAIS

Os minerais podem ser fornecidos de forma orgânica, também dito como mineral quelatado ou na forma inorgânica. Na forma orgânica, os minerais são mais eficientemente

absorvidos, uma vez que são transportados pelos carreadores intestinais de aminoácidos e peptídeos e não competem com outros minerais pelos mesmos mecanismos de absorção. Portanto, não só a biodisponibilidade é superior, mas os minerais na forma orgânica são armazenados por períodos mais longos que os inorgânicos. Assim, os minerais quelatados representam excelente alternativa para o aprimoramento nutricional de aves (FIGUEIREDO JÚNIOR et al., 2013).

Dentre os minerais utilizados na suplementação de aves, pensando em resposta imune, são de grande importância o selênio, zinco, ferro e cromo.

3.2.1 Selênio

É micromineral importante no corpo animal. Pode ser fornecido na forma quelatada ou na forma inorgânica em rações para aves. É antioxidante altamente eficaz, pois desempenha papel metabólico junto com glutationa peroxidase para proteger as células do corpo dos danos causados pela formação de peróxidos de hidrogênio (SHOJADOOST et al., 2019).

O selênio quelatado, normalmente está associado a metionina, formando a seleno metionina ou incorporado a cistepina, formando selenocisteína, e quando estes aminoácidos são utilizados na síntese de proteína, formam as chamadas selenoproteínas. No sistema imunológico as selenoproteínas realizam o dobramento de proteínas e sinalizam alguns eventos necessários a ativação celular. As células do sistema imunológico expressam várias selenoproteínas, das quais as isoenzimas 1 e 4 da glutona peroxidase (GPx) demonstraram ter os mais altos níveis de expressão, principalmente nas células T e macrófagos (SHOJADOOST et al., 2019).

Em estudos com poedeiras, Shojadoost et al. (2019) observaram que o selênio tem ação na redução significativa do vírus da influenza aviária H9N2, em amostras cloacais e orafarigeanas. Esse número se tornou significamente menor quando as aves foram suplementadas com selênio orgânico. Verificou-se que as galinhas suplementadas com selênio tinham expressão significativamente maior de IFN- α, β e γ, maior expressão dos genes OEA, MDA5 e viperina, maior produção de interferon e ISG nestes tecidos após o desafio do vírus em comparação com os controles não tratados. Portanto, a suplementação de selênio aumenta a expressão dos genes de resposta antiviral que podem levar à redução da transmissão de vírus pelas aves infectadas.

Xing et al. (2018) mostrou a ação antagônica do selênio (Se) sobre efeito tóxico do chumbo (Pb), administrando concomitantemente 1 mg/kg/dia de selênio e chumbo, que resultou em reversão das alterações de citocinas induzidas nos neutrófilos acompanhadas por diminuição

significativa nas proteínas de choque térmico (HSPs). A suplementação de Se aumentou os níveis de IL- (1 β, 1R, 4, 8, 10 e 12) e TGF-β 4 mRNA e os níveis reduzidos de IL-2 e IFN- γ, o mRNA induzido por Pb retornou quase aos níveis observados no grupo controle.

3.2.2 Zinco

O Zn é um oligoelemento essencial que funciona em várias vias metabólicas. Várias funções fisiológicas, incluindo tradução, transporte, replicação e expressão de genes na síntese de DNA, proliferação celular, crescimento, sistema imunológico, reprodução, secreção hormonal como a testosterona, insulina e corticoide, sistema de defesa antioxidante (ABEDINI et al., 2018), cofator de enzimas envolvidas no metabolismo protéico e energético, manutenção da concentração normal de vitamina A no sangue, além de muitos processos bioquímicos estão associadas ao zinco (MORAES, 2018).

É importante ainda, para a síntese do colágeno e queratina e ácidos nucléicos na pele, atuando assim na manutenção da qualidade da pele. A sua deficiência afeta a imunidade inata e adquirida, causa atrofia no timo, assim como os níveis de timulina, e como consequência o menor número de células T (afetando o processo de fagocitose dos macrófagos, lise celular mediada por células natural killer e ação citolítica) (SILVA et al., 2013).

Abedini et al. (2018) observaram que matrizes em idades mais avançadas, quando suplementadas com 80 mg/kg de zinco apresentaram maior resposta imune ao teste de fitohemaglutinina e títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle. Atribuíram esses resultados a ação do zinco sobre a timulina.

3.2.3 Ferro

O ferro é essencial para muitos processos bioquímicos, incluindo transporte de oxigênio e hematopoiese, e a redução dos níveis desse mineral pode levar à anemia. Esta anemia pode estar associada a redução da resistência a infecções (NOH et al., 2017).

Os macrófagos teciduais normalmente sequestram o Fe reduzindo a disponibilidade deste no soro. O sequestro de Fe pelos macrófagos teciduais é uma forma de imunidade nutricional, porque a maioria das bactérias requer o Fe para replicação (NOH et al., 2017).

Jarosz et al. (2016) demonstraram em trabalhos com frangos de corte suplementados com 40 mg de ferro quelato, aumento na porcentagem de células Th1. Também foi demonstrado

que a aplicação de ferro quelatado pode aumentar a produção de células T CD8 + citotóxicas e IL-2, promovendo a resposta natural do organismo ao desenvolvimento de resposta imune.

3.2.4 Cromo

O cromo (Cr) é mineral importante nas funções de digestão, crescimento, redução da peroxidação de lipídios e proteínas, status imunológico e perfil antioxidante. O cromo é proposto como peça proativa da biomolécula cromodulina, que é parte da via de sinalização da insulina. Capacidade imunológica pelo cromo, parecem ser mais articuladas em meio às estações de estresse térmico (EZZAT et al., 2018).

Em situações de estresse como fadiga, transtornos metabólicos, nutricionais, ambientais, dentre outros, ocorre aumento na necessidade nutricional do Cr. Nessas situações ocorre aumento nos níveis de glicose no sangue, assim como o hormônio cortisol, aumentando a mobilização de Cr tecidual para formação do GTF. O cortisol, além de possuir efeito imunossupressor, é antagônico à insulina e, nessa situação, o Cr mobilizado, para ação da insulina, é eliminado pela urina (MANZKE, 2012).

Também há relação do Cr com o sistema imune, pois quando suplementado na dieta exerce efeito na proliferação de linfócitos e aumento na produção de anticorpos (EZZAT et al., 2018).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem vários pontos em que a nutrição está ligada a imunologia e nas aves, isso ocorre desde o ovo até as primeiras semanas de vida, visto que a deficiência de micronutrientes envolvidos na formação de órgãos linfoides e proliferação de linfócitos tem impacto negativo na vida futura da ave. A dieta bem balanceada pode contribuir com o fortalecimento do sistema imunológico dos animais, possibilitando alterar positivamente as respostas imunológicas as doenças e colaborando com o desempenho e bem estar animal.

Um alimento balanceado adequadamente, destinado à alimentação animal, é nutricionalmente completo quando reduz o estresse, minimiza deficiências, melhora a competência imunológica e produz carcaça de qualidade, com melhor desempenho e maior lucratividade.

5 REFERÊNCIAS

ABEDINI, M. et al. Effects of zinc oxide nanoparticles on the egg quality, immune response, zinc retention, and blood parameters of laying hens in the late phase of production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, United Kingdom, v. 102, n. 3, p. 736-745, 2018.

AHMAD, S. et al. Effects of supplementing different linoleic to α-linolenic acid ratios and vitamin A on performance and egg quality characteristics of laying hens during summer months. **Animal Nutrition and Feed Technology**, Índia, v. 19, n. 1, p. 101-110, 2019.

ATTIA, Y. A. et al. Laying performance, digestibility and plasma hormones in laying hens exposed to chronic heat stress as affected by betaine, vitamin C, and/or vitamin E supplementation. **Springer Plus**, Germany, v. 5, n. 1619, p. 1-12, 2016.

BIASEBETTI, M. B. C.; RODRIGUES, I. D.; MAZUR, C. E. Relação do consumo de vitaminas e minerais com o sistema imunitário: uma breve revisão. **Biblioteca Digital de Periódicos**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 130-136, 2018.

BOODHOO, N. et al. Marek's disease in chickens: a review with focus on immunology. **Veterinary Research**, Paris, v. 47, n. 119, p. 1-19, 2016.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Interação entre imunidade e nutrição das aves: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, n. 24, p. 1-20, 2015.

DARABIGHANE, B. et al. Effect of *Aloe vera* and vitamin E supplementation on the immune response of broilers. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellin, n. 30, p. 159-164, 2017.

EBRAHIMZADEH, S. K. et al. Effects of grape pomace and vitamin E on performance, antioxidant status, immune response, gut morphology and histopathological responses in broiler chickens. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v. 48, n. 2, p. 324-336, 2018.

EL-SENOUSEY, H. K. et al. In ovo injection of ascorbic acid modulates antioxidant defense system and immune gene expression in newly hatched local Chinese yellow broiler chicks. **Poultry Science**, College Station, v. 97, n. 2, p. 425-429, 2018.

EZZAT, W. et al. The effect of chromium picolinate supplementation on immune response and heat shock proteins of laying hens under heat stress conditions. **Egyptian Poultry Science**, Alexandria, v. 38, p. 65-89, 2018.

FIGUEIREDO JÚNIOR, J. P. et al. Substituição de minerais inorgânicos por orgânicos na alimentação de poedeiras semipesadas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 2, p. 513-518, 2013.

HERNANDEZ-PATLAN, D. et al. Evaluation of ascorbic acid or curcumin formulated in a solid dispersion on *Salmonella Enteritidis* infection and intestinal integrity in broiler chickens. **Pathogens**, Switzerland, v. 8, n. 10, p. 229, 2019.

JAROSZ, L. et al. Effects of feed supplementation with glycine chelate and iron sulfate on selected parameters of cell-mediated immune response in broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, London, v. 107, p. 68-74, 2016.

LARANGE, A.; CHEROUTRE, H. Retinoic acid and retinoic acid receptors as pleiotropic modulators of the immune system. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 20, n. 34, p. 369-394, 2016.

LEMOS, M. J. et al. Uso de aditivo alimentar equilibrador da flora intestinal em aves de corte e de postura. **Arquivos do Instituto de Biologia**, Vila Mariana, v. 83, p. 1-7, 2016.

LIU, Y. J. et al. Protective effect of vitamin E on laying performance, antioxidant capacity, and immunity in laying hens challenged with *Salmonella Enteritidis*. **Poultry Science**, College Station, v. 98, n. 11, p. 5847-5857, 2019.

MANZKE, N. E. **Cromo e selênio orgânicos na dieta de poedeiras semipesadas alojadas em ambientes com temperaturas elevadas.** 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS, 2012.

MORAES, T. A. **Níveis de zinco em dietas para codornas japonesas na fase inicial em dois ambientes térmicos**. 2018. 58 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2018.

MUBILA, L. F. et al. Effects of vitamin A supplementation in local free range chickens vaccinated with Newcastle disease vaccine in Wami Dakawa. **Tanzania Veterinary Journal**, Grahamstown, v. 36, n. 1, p. 50-53, 2018.

NOH, H. J. et al. Guanosine 5′-monophosphate-chelated calcium and iron feed additives maintains egg production and prevents *Salmonella Gallinarum* in experimentally infected layers. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 18, n. 3, p. 291 - 297, 2017.

NRC (National Research Council). **Nutrient requirements of poultry**. 9. ed. Washington: The National Academies Press, 1994.

PENZ JUNIOR, A. M. Sustentabilidade na produção avícola. **Feed & Food**, 2019. Disponível em: <http://www.feedfood.com.br/pt/network/5/sustentabilidade-na-producao-avicola> Acesso em: 16 jun. 2020.

POMPEU, M. A.; CAVALCANTI, L. F. L.; TORAL, F. L. B. Effect of vitamin E supplementation on growth performance, meat quality, and immune response of male broiler chickens: a meta-analysis. **Livestock Science**, Holanda, v. 208, p. 5-13, 2018.

RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C. et al. The immunomodulatory effect of vitamin D in chickens is dose-dependent and influenced by calcium and phosphorus levels. **Poultry Science**, College Station, v. 95, n. 11, p. 2547-2556, 2016.

RUTZ, F. et al. Impacto nutricional sobre a resposta imunológica das aves. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 3, 2002, Chapecó. **Anais...** p. 1 -15, 2002.

SHARMA, S. et al. General performance observations in broiler chickens experimentally inoculated with *Salmonella Enteritidis* and its amelioration with vitamin C. **International Journal of Current Microbiological Applied Science**, London, v. 8, n. 8, p. 1224-1233, 2019.

SHOJADOOST, B. et al. Dietary selenium supplementation enhances antiviral immunity in chickens challenged with low pathogenic avian influenza virus subtype H9N2. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 207, p. 62–68, 2019.

SILVA, S. R. G. et al. Fundamentos da imunonutrição em aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, Belo Horizonte, v. 10, n. 1, p. 2154 – 2172. 2013.

SIRISINHA, S. The pleiotropic role of vitamin A in regulating mucosal immunity. **Asian Pacific Journal Allergy Immunological**, Thailand, v. 33, n. 2, p. 71-89, 2015.

SOUZA, C. S. et al. Importance of intestinal health in broilers. **Research Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 9, p. e86932475, 2020

STEPHENSEN, C. B. Vitamin A, infection, and immune function. **Annual Review of Nutrition**, Califórnia, v. 21, p. 167-192, 2001.

TREVISOL, I. M. **Sistema imune das aves. Avicultura industrial**, 2008. Disponível em: <https://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/sistema-imune-das-aves/20080911-111208-3311> Acesso em: 20 abr. 2020.

VAZQUEZ, J. R. et al. Effects of 25-hydroxycholecalciferol with two D3 vitamin levels on production and immunity parameters in broiler chickens. **Journal Animal Physiological Animal Nutrition**, United Kingdom, v. 102, n. 1, p. 493-497, 2018.

XING, M. et al. The antagonistic effect of selenium on lead-induced immune dysfunction via recovery of cytokine and heat shock protein expression in chicken neutrophils. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 185, p. 162–169, 2018.

Biodigestão anaeróbia: uma alternativa viável para a redução dos impactos causados pelos dejetos da pecuária leiteira

Mikaela Vieira Beloni[1]
Nicolly Soares Ferreira[2]
Mariana Drummond Costa Ignacchiti[3]
Marcelo Henrique Otenio[4]
Juliana Alves Resende[5]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: mikaelabeloni@hotmail.com
[2] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: ni.colly_ferreira@hotmail.com
[3] Universidade Federal do Espirito Santo, e-mail: mariana.ignacchiti@ufes.br
[4] Embrapa Gado de Leite, e-mail: marcelo.otenio@embrapa.br
[5] Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: juliana.resende@ufes.br

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva da pecuária tem se tornado cada vez mais significativa economicamente, tendo como obstáculo, a difícil conciliação da preservação do meio ambiente e o desenvolvimento rural sustentável, com a utilização racional dos recursos naturais e monetários disponíveis (INCAPER, [2020]). Nesse quadro, a ampliação e intensificação das atividades pecuárias resultam em novas exigências para o descarte seguro de grandes quantidades de dejetos (KARIM et al., 2005). Sendo uma alternativa viável o emprego desses dejetos, produzidos pela pecuária leiteira, como biomassa de origem animal. Esta biomassa é de grande valor caso empregado um bioprocesso, para exploração do potencial energético deste resíduo. Nesse novo cenário em que vigora a pecuária moderna, o biodigestor desponta-se como tecnologia viável para o gerenciamento dos resíduos animais (COLATTO; LANGER, 2011).

A denominação, biomassa, é dada a materiais suscetíveis a serem decompostos pela ação de diferentes tipos de microrganismos em virtude de fatores como: presença ou não de oxigênio, temperatura, nível de umidade, quantidade de microrganismos, entre outros (COLATTO; LANGER, 2011). Os principais componentes presentes na biomassa são polímeros como carboidratos, proteínas, celulose, lignina e gordura. A quantidade e o tipo de microrganismos presentes na decomposição da biomassa, podem variar devido ao tipo de biomassa empregados no processo (DIVYA; GOPINATH; CHRISTY, 2015). A produção de energia a partir da biomassa pode dar-se pelo processo de digestão anaeróbia. Anaerobicamente, moléculas complexas são transformadas em estruturas mais simples como o biogás, composto por metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2). Como resultados têm-se a redução de sólidos voláteis, e um fluente com considerável manutenção das concentrações de Nitrogênio/Fósforo e Potássio (NPK), que pode ser utilizado como biofertilizante (BORGES et al., 2017; MENDONÇA; OMETTO; OTENIO, 2017).

A preocupação existente quanto ao destino dos dejetos animais, se deve principalmente a prática agrícola comum de aplicação desses dejetos como fertilizantes no solo. Por muito tempo esta foi considerada como prática sustentável na agricultura, porém, suscita preocupações a nível de saúde pública, devido a possíveis impactos ambientais e ecológicos (CHEN et al., 2019).

Importante destacar, que a tecnologia de produção de biogás ainda é incipiente no país e, durante longo período (1970 a 2010), o tema não recebeu a importância adequada. A partir de 2010, o biogás passou a ser considerado um ativo energético, resultado de sua viabilidade econômica e técnica. Além disso, os impactos ambientais positivos também motivam o setor

no Brasil, seja como solução para a questão ambiental ou como mudança de oferta de energia (FREITAS et al., 2019; MATHIAS; MATHIAS, 2015).

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem diversos programas que preconizando boas práticas agropecuárias (BPA), e levam para conceitos de sustentabilidade. Dentre as diversas abordagens pode-se citar: Plano ABC (agricultura de baixo carbono), agroenergia, produção integrada da cadeia pecuária, agricultura orgânica, integração lavoura, pecuária e floresta (ILPF), conservação do solo e água, plantio direto, recuperação de áreas degradadas, indicação geográfica de origem, florestas plantadas, entre outras tecnologias agropecuárias. No ano de 2019, foi publicado uma nota técnica do plano ABC sobre os resultados do "Diagnóstico da expansão da adoção da tecnologia de tratamento de dejetos animais no território brasileiro", e pela primeira vez, foi possível mostrar a grande evolução do país no uso de tecnologias que efetivamente mitigam os gases de efeito estufa (GEE) que podem em alguns casos chegar a efetivamente zerar a conta da emissão e mitigação da produção agropecuária. No período de 2010 até 2019 foram tratados em torno de 38,3 milhões de m^3 de dejetos da pecuária, estimativa realizada com base nos dados do diagnóstico. De acordo com o relatório, a meta do Governo Brasileiro era tratar 4,4 milhões de m^3 de dejetos, e o país superou a meta em 8,7 vezes. Da mesma forma, a meta para mitigação de emissões do gás carbônico equivalente (tCO_2eq) também foi superada em 56,7 vezes, sendo mitigadas ao todo 391,2 milhões de tCO_2eq entre os anos de 2010 e 2019 (MAPA, 2019).

Desta maneira, o tratamento dos dejetos de animais da pecuária através da biodigestão, pode gerar benefícios adicionais para o país e meio ambiente. Dentre estes podemos citar: geração de energia elétrica e térmica renovável, redução da emissão de GEE, redução do lançamento de resíduos (biomassa orgânica) que podem atuar como contaminantes e reservatório de bactérias resistentes nos ecossistemas associados e por fim a substituição de fontes fósseis de energia e de fertilizantes químicos. Há ainda o benefício direto para os produtores, quando o biogás é utilizado na geração de energia, promovendo melhoria na renda e redução de custos (MAPA, 2019).

2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E CRESCIMENTO DA PECUÁRIA

A pecuária, atividade desenvolvida em grande extensão do território brasileiro, destacando-se como um dos principais pilares econômicos do país. No Brasil, a criação de gado teve seu início durante o século XVI, na terceira década após o início do processo de colonização (TEIXEIRA; HESPANHOL, 2014). A atividade exerceu forte influência na

expansão econômica, destacando-se na pauta das exportações e exercendo também importante participação no abastecimento do mercado interno, totalizando US$ 58 milhões no ano de 2018 (EMBRAPA, 2019).

Segundo o relatório das Nações Unidas, neste momento a população mundial ultrapassou sete bilhões de pessoas, com expectativa de crescer cerca de um bilhão nos próximos 10 anos e alcançar 9,7 bilhões em 2050 (UN DESA, 2019). Com o crescente aumento da população, a expectativa é que se aumente também o consumo global de alimentos, principalmente aos de origem animal (FAO, 2009). O leite é um dos produtos com grande expectativa de aumento da demanda, sua produção deverá crescer a taxa anual entre 2,4 e 3,3%, o que corresponde a alta produção que ultrapassa 47 milhões de litros de leite cru no final do período das projeções de 2025 (BERNDT et al., 2018).

Para acompanhar essa crescente demanda por alimentos, o rebanho mundial de bovinos tem demonstrado forte crescimento. Entre 1974 e 2017, o Brasil registrou crescimento de 271% na produção de leite, enquanto a média do crescimento mundial no mesmo período foi de 75%, diante disto, atualmente o Brasil detém a posição de 3º maior produtor de leite do mundo e 2º maior rebanho, com mais de 200 milhões de animais (EMBRAPA, 2019). O país também se destaca como o maior exportador de carne bovina do mundo, no primeiro trimestre de 2020 as exportações de carne bovina brasileiras acumularam 353,46 mil toneladas (FERREIRA; MIZIARA; COUTO, 2020; IBGE, 2020). Este setor tem se tornado cada vez mais significativo economicamente, somando R$ 597,22 bilhões em 2018, aumento de 8,3% do valor apurado em 2017. Com isso, o PIB da pecuária sofreu elevação de 8,7% em sua participação no PIB total brasileiro (IBGE, 2018).

O Espírito Santo possui um rebanho bovino estimado em dois milhões de cabeças, entre gado de corte e de leite (IBGE, 2018). Segundo o Incaper (2020), entre o final de 2018 e início de 2019, a pecuária leiteira capixaba produziu 330 milhões de litros de leite, com o rebanho de 213 mil vacas ordenhadas, o que equivale a média diária de 55 litros de leite por propriedade. No ano de 2017, a pecuária de corte e de leite do Espírito Santo alcançou R$1.104.475,00, com a participação de 12% no valor bruto da produção agropecuária do Estado, sendo R$ 426.706,00 (4,6%) da pecuária leiteira e R$ 677.769,00 (7,4%) da pecuária de corte (GALEANO et al., 2018). Este setor envolve participação de 35.261 propriedades e 32 mil produtores capixabas, sendo 18 mil de leite e 14 mil de corte (INCAPER, 2020). Neste contexto, a pecuária bovina de corte e de leite exerce importante participação na economia e na comunidade do Espírito Santo, em especial a região sul - capixaba.

3 IMPACTOS AMBIENTAIS E SANITÁRIOS CAUSADOS PELA PECUÁRIA

A ampliação e intensificação da pecuária têm por consequência o aumento da produção de dejetos, os quais podem representar um problema de segurança ambiental e causarem riscos à saúde pública. Uma vez que quando mal manejados, esses resíduos se tornam potenciais fontes de contaminação dos ecossistemas associados (VENGLOVSKY; MARTINEZ; PLACHA, 2006). Esses resíduos apresentam alta DBO (demanda bioquímica de oxigênio), o que contribui para redução do teor de oxigênio da água, morte de peixes e microrganismos. Além disso, os diversos nutrientes contidos nesses resíduos (principalmente N, P e K) estimulam a proliferação de algas devido à eutrofização (fertilização) dos corpos d'água (CAMPOS; CAMPOS; PIRES, 2003).

Além desses fatores, a liberação incorreta dos dejetos favorece a propagação de patógenos como, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp. e *Yersinia* spp. (BISWAS; PANDEY; FARVER, 2016). Ao mesmo tempo, manejo de animais é frequentemente citado como reservatório de bactérias resistentes e de genes de resistência a antibióticos (CHEN et al., 2019; RESENDE et al., 2014). No que se refere à disseminação dos resíduos de antibióticos, deve ser considerado que a maioria dos antibióticos e biocidas administrados na produção animal, para controle/prevenção de doenças, muitas vezes são excretados inalterados ou apenas parcialmente metabolizados no ambiente (GUDDA et al., 2020; LAU et al., 2020).

O uso de antibióticos na pecuária teve início há mais de 60 anos, desde então a utilização destes compostos tem criado condições adequadas para a emergência e a disseminação de bactérias resistentes (GUARDABASSI; KRUSE, 2010). A transmissão de patógenos resistentes a antibióticos do animal para o homem pode ocorrer por meio de alimentos e água contaminados por resíduos do trato gastrointestinal de animais e do ambiente em que os resíduos de animais abatidos são descartados. Assim sendo, as saúdes humanas, animais e ambientais estão interconectadas, de forma que o uso de antibióticos na pecuária tem consequências para a situação da resistência antimicrobiana em humanos, gerando enormes custos socioeconômicos (AHMAD; KHAN, 2019).

Um bovino elimina o equivalente a 9% do seu peso por dia em excretas, sendo que 60% de fezes com teor de água de 85%. Uma vaca leiteira, com peso médio de 400 kg, elimina diariamente o equivalente a 28-32 kg de fezes, totalizando a produção de fezes e urina na faixa de 38 – 50 kg. Estes resíduos podem se tornar uma oportunidade para o produtor se manejados adequadamente (EMBRAPA, 2019).

Dentre os resíduos mais utilizados no sistema de biodigestão anaeróbia destacam-se os dejetos animais, em particular os de origem suína e bovina (ABDESHAHIAN et al., 2016; MAPA, 2019). Devido às significativas quantidades de nutrientes (carboidratos, proteínas e gorduras) e microrganismos necessários para dar a partida no processo, este material apresenta grande potencial de utilização como substrato para biodigestores (SANTOS; NOGUEIRA, 2012).

4 BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

A biodigestão anaeróbia é um processo biológico natural que consiste na biodegradação da biomassa na ausência de oxigênio. Este processo pode ocorrer em sistema fechado, como biodigestores, no meio ambiente em condições anaeróbicas ou no sistema digestivo de ruminantes, no qual um consórcio de diferentes microrganismos interagem sinergicamente na transformação da matéria orgânica em CO_2 e CH_4 (AMARAL; STEINMETZ; KUNZ, 2019; BORGES et al., 2017; SOARES, 2018). Geralmente, esse processo consiste em liquefação e hidrólise de compostos insolúveis e gaseificação de produtos intermediários. Além disso, ocorre umidificação da substância orgânica e, finalmente, a produção de efluente, que pode ser utilizado como biofertilizante (ZIEMIŃSKI; FRĄC, 2012).

A comunidade microbiana do processo anaeróbico é muito complexa. Existem dois reinos procarióticos que interagem estreitamente entre si: *Bacteria* e *Archae*. Este processo de biodegradação da biomassa é dividido em quatro fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, onde em cada uma há a atuação de microrganismos específicos (FIGURA 1). As etapas de transformação dos compostos ocorrem simultaneamente, o produto de cada etapa é utilizado como substrato de outra, cada uma com populações microbianas específicas envolvidas no processo de formação do biogás e do biofertilizante (AMANI; NOSRATI; SREEKRISHNAN, 2010).

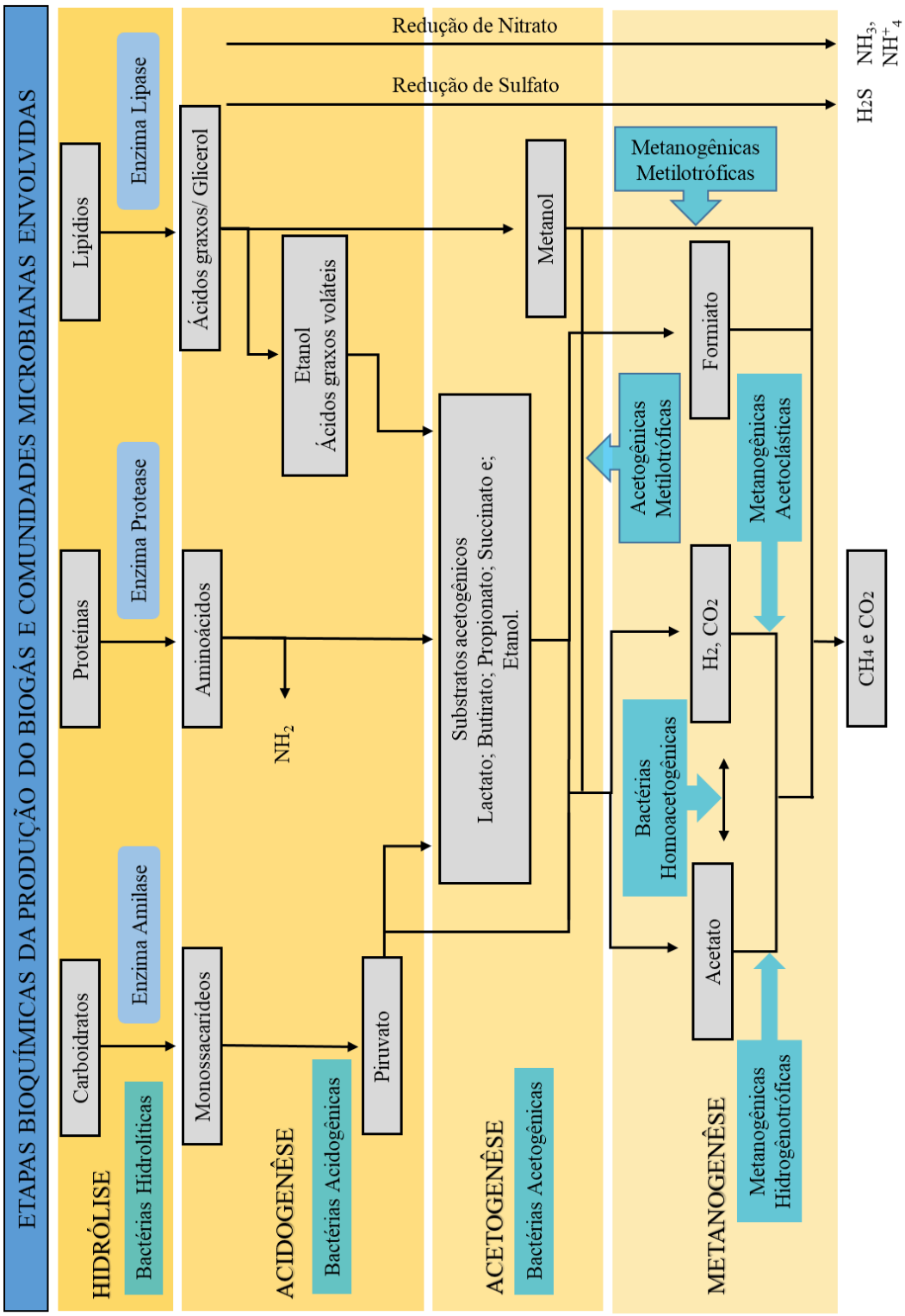

Figura 1 – Etapas bioquímicas da produção de biogás, substratos e comunidades microbianas envolvidas.

Fonte: Adaptado de Amaral; Steinmetz; Kunz, (2019); Borges et al. (2017); Oliveira (2019) e Soares (2018).

4.1 HIDRÓLISE

O processo de digestão anaeróbia inicia-se pela hidrólise, etapa em que ocorre a redução de compostos com alto peso molecular como lipídeos, proteínas e carboidratos em substâncias orgânicas mais simples e solúveis (AMANI; NOSRATI; SREEKRISHNAN, 2010). Esta etapa é executada por diversas enzimas extracelulares excretadas por bactérias fermentativas hidrolíticas (OLIVEIRA, 2019), sendo as lipases, proteases, amilases e celulases, as principais enzimas extracelulares envolvidas neste processo. A duração da etapa de hidrólise varia de acordo com as características do substrato, podendo ser de poucas horas para carboidratos e dias para proteínas e lipídios (AMARAL; STEINMETZ; KUNZ, 2019).

A taxa do processo de hidrólise depende de parâmetros como: tamanho das partículas, pH, produção de enzimas, difusão e adsorção de enzimas nas partículas de resíduos sujeitas ao processo de digestão. A degradação da biomassa a compostos simples e solúveis é essencial para aumentar a biodisponibilidade do material, ou seja, o acesso do substrato às células microbianas, sendo uma etapa limitante do processo (ABBASI; TAUSEEF; ABBASI, 2012; ZIEMIŃSKI; FRĄC, 2012).

4.2 ACIDOGÊNESE

Nesta fase, os produtos da etapa hidrolítica são metabolizados por bactérias fermentativas acidogênicas e transformados em ácidos orgânicos de cadeia curta (principalmente acético, propiônico e butírico), álcoois (etanol), cetonas (acetona), óxidos de nitrogênio, sulfeto de hidrogênio, CO_2 e H_2. Durante esta fase, o estado de oxidação dos produtos é afetado diretamente pela quantidade de hidrogênio dissolvido na mistura. Se a concentração de hidrogênio for muito elevada, haverá acúmulo de orgânicos de cadeia longa e consequentemente menor formação de ácido acético (ABBASI; TAUSEEF; ABBASI, 2012; AQUINO; CHERNICHARO, 2005; ZIEMIŃSKI; FRĄC, 2012).

Uma complexa comunidade de microrganismos participa nessa fase, em sua maioria são bactérias anaeróbias obrigatórias. Uma porcentagem mínima desta comunidade consiste em bactérias facultativas, as quais podem metabolizar a matéria orgânica por via oxidativa, utilizando oxigênio, como aceptor de elétrons. Desta forma, os resíduos de oxigênio dissolvido no sistema são removidos, prevenindo a formação de radicais livres e eliminando seu efeito tóxico sobre os microrganismos anaeróbios obrigatórios da fase sequencial, como as arqueas metanogênicas (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

Na acidogênese, os carboidratos são degradados a piruvato. O piruvato por sua vez é convertido em etanol e ácido láctico. Já os ácidos graxos são metabolizados através da β-oxidação. Durante este processo há a liberação sequencial de duas unidades de carbono, na forma de acetato. Enquanto os aminoácidos são metabolizados aos pares, através da reação de Stickland (os aminoácidos envolvidos atuam com par redox), produzindo acetato, amônia, dióxido de carbono e sulfeto de hidrogênio (AMARAL; STEINMETZ; KUNZ, 2019).

4.3 ACETOGÊNESE

Nesta etapa, os produtos da acidogênese são transformados, pela ação das bactérias acetogênicas, em ácidos orgânicos (fórmico e acético), CO_2 e H_2 (AMANI; NOSRATI; SREEKRISHNAN, 2010), substratos intermediários que serão metabolizados pelas arqueas metanogênicas.

A acetogênese é considerada etapa crítica no processo de biodigestão anaeróbia, uma vez que a concentração de hidrogênio da mistura precisa ser controlada para que se possa manter o equilíbrio geral do processo (AMARAL; STEINMETZ; KUNZ, 2019). Uma alta concentração de hidrogênio interfere na metabolização dos ácidos orgânicos (gerados na fase de acidogênese) pelas bactérias acetogênicas e o acúmulo de ácidos inibe a ação das bactérias metanogênicas, comprometendo a fase sequencial (AMANI; NOSRATI; SREEKRISHNAN, 2010).

As bactérias acetogênicas são classificadas em dois grupos: acetogênicas produtoras obrigatórias de hidrogênio, elas produzem ácido acético, CO_2 e H_2; e homoacetogênicas, bactérias estritamente anaeróbias que catalisam a produção de acetato a partir de CO_2 e H_2 (KUMAR et al., 2013). As bactérias homoacetogênicas regem o equilíbrio da concentração de hidrogênio, pois produzem o acetato a partir do CO_2 e H_2. Para que a reação seja termodinamicamente favorável, esta deve ocorrer associada também ao consumo de hidrogênio pelas arqueas metanogênicas, prevenindo o aumento da pressão de hidrogênio no sistema de biodigestão (AMARAL; STEINMETZ; KUNZ, 2019).

4.4 METANOGÊNESE

A última etapa é a metanogênese, nesta o carbono contido na biomassa é convertido em CO_2 e CH_4 pelas arqueas metanogênicas. O mecanismo de metanogênese pode acontecer a partir de três vias distintas (acetoclástica, hidrogenotrófica e metilotrófica), a depender do

substrato utilizado pelas arqueas para produção de CH_4 (NGUYEN; NGUYEN; NGHIEM, 2019). A metanogênese acetoclástica ocorre a partir da redução do acetato em CH_4, em uma reação heterotrófica. Por outro lado, a produção de CH_4 na metanogênese hidrogenotrófica ocorre com a redução de CO_2, utilizando o H_2 como doador de elétrons e liberando H_2O, em uma reação autotrófica. Já a terceira via de produção de metano, a via metilotrófica, acontece a partir da redução de compostos metilados (metanol e metilamina) a CH_4 e CO_2 (NGUYEN; NGUYEN; NGHIEM, 2019).

5 PRODUTOS DA BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

Os principais produtos da biodigestão anaeróbia são o biogás que é um conjunto de gases, no qual se encontra principalmente CH_4 e CO_2, e o biofertilizante que é um líquido efluente comumente utilizado na agricultura por manter as características de fertilidade que são essenciais ao solo (HOLLY et al., 2017; MENDONÇA et al., 2018).

5.1 BIOGÁS

O biogás é um biocombustível renovável, o qual apresenta potencial energético. É uma mistura gasosa composta por CH_4 e CO_2, e outros gases em pequenas concentrações. O potencial energético do biogás é atribuído principalmente ao CH_4, que é um gás altamente combustível e inflamável. Atualmente, a utilização do biogás tem sido amplamente discutida e segundo Qian et al. (2019), o principal desafio da aplicação em larga escala do biogás é a instabilidade na produção de seus componentes, devido as diferenças no processo de produção e das matérias-primas utilizadas.

Segundo Abbasi, Tauseef e Abbasi (2012), em teoria a produção de biogás deveria conter volumes iguais (50/50%) de CH_4 e CO_2. No entanto, a etapa de acetogênese normalmente produz hidrogênio e, para cada quatro moles de hidrogênio consumidos por metanógenos hidrogenotróficos, um mol de CO_2 é convertida em CH_4. Além disso, substratos contendo gorduras e proteínas podem produzir quantidades maiores de hidrogênio, levando a um teor típico maior de CH_4 para esses substratos. Portanto, o rendimento global de biogás e o volume de CH_4 produzido dependem da biomassa utilizada, do tipo de inóculo e da tecnologia empregada na biodigestão. O teor de CH_4 no biogás pode variar de 40 a 70% (em volume), mas na maioria das vezes é de 55 a 65% (TABELA 1).

Tabela 1 - Faixas de variação da concentração dos gases que compõe o biogás.

Composto		Concentração (%)
Metano	CH_4	40 – 70
Dióxido de carbono	CO_2	30 – 45
Hidrogênio	H_2	0 – 1
Nitrogênio	N_2	0 – 1
Ácido sulfídrico	H_2S	0 – 3
Vapor de água	H_2O	0 – 10

Fonte: Adaptado de Oliveira (2019).

A principal aplicação do biogás é no processo de combustão direta, em que o gás é queimado nas câmaras de combustão de turbinas a gás, caldeiras, aquecedores e secadores. O calor liberado é usado nos processos de produção e geração de eletricidade. Em motores de combustão interna, a energia do biogás é convertida em energia mecânica, que, nas áreas rurais, podem ser conectados ao motogerador para geração de eletricidade (FREITAS et al., 2019).

O CH_4 é um gás com potencial causador de efeito estufa de 21 vezes mais que o CO_2 (MAPA, 2019). A sua queima destaca-se entre as vantagens do processo, para produção de energia e geração de CO_2, que é menos poluente. Assim, o uso de biodigestores pode reduzir, por meio da captura e queima do biogás, a emissão de gases que atuam sobre as mudanças climáticas (BORGES et al., 2017; SOARES, 2018).

O poder calórico do biogás varia entre 5.000 e 7.000 Kcal/m^3, sendo diretamente proporcional a quantidade de CH_4 presente na composição. O biogás depois de purificado pode chegar a 12.000 Kcal/m^3 (OLIVEIRA, 2019). A Tabela 2 mostra a equivalência de 1m^3 de biogás em relação a algumas fontes de energia conhecidas.

Segundo Mendonça, Ometto e Otenio (2017) o rendimento volumétrico do biogás pode variar em função das cargas diárias de biomassa adicionadas ao biodigestor, podendo ser alcançada produção de energia suficiente para atender às necessidades energéticas de uma fazenda e do sistema de tratamento em si, tornando o processo de biodigestão autossuficiente. Os autores relataram que em um sistema de biodigestão, operado em escala real por 12 meses à temperatura ambiente e sob fluxo contínuo, quando aplicado carga de 114 a 294 kg de biomassa por dia, a produção de biogás variou de 378,5 a 2806 m^3 mês^{-1}, proporcionando a geração de 2070 a 19.168 kWh mês^{-1}, energia suficiente para atender às necessidades da fazenda e do próprio sistema de tratamento.

Tabela 2 – Equivalência energética de 1m^3 de biogás a outras fontes de energia.

Fontes	Equivalência energética a 1 m^3 de biogás
Gasolina	0,613 m^3
Querosene	0,579 m^3
Óleo diesel	0,553 m^3
Álcool hidratado	0,790 m^3
Lenha	1,536 kg
Energia elétrica	1,428 m^3

Fonte: Adaptado de Poblete (2019) e Oliveira (2019).

Do ponto de vista econômico, a possibilidade de que a energia elétrica produzida a partir do biogás seja injetada na rede, regulamentada pela resolução Aneel 482/2012 e alterada pela 687/2015, tem promovido avanços no uso da biodigestão (ANEEL, 2012; 2015). Assim, a utilização do biogás, aplicado na geração de energia deve ser incentivada e planejada de forma integrada pelos diversos órgãos de governo e pelas empresas, visando à redução de custos para o produtor rural e consequente melhorias na renda (MAPA, 2019).

5.2 BIOFERTILIZANTE

Após o processo de biodigestão anaeróbia, tem-se como produto um efluente rico em nutrientes, comumente empregado como biofertilizante na agricultura (DOTTO; WOLFF, 2012). Os biofertilizantes são suplementos de nutrientes e insumos de origem biológica, que auxiliam no crescimento de plantas. Possibilita a aceleração de processos microbianos no solo que aumentam a extensão da disponibilidade de nutrientes de forma facilmente assimilável pelas plantas e também mobilizam elementos nutritivos da forma não utilizável para a forma utilizável através de processos biológicos (ALFA et al., 2014).

Durante a digestão anaeróbica, o carbono, hidrogênio e oxigênio da biomassa são removidos, sendo que a perda de carbono ocorre exclusivamente sob a forma de CH_4 e CO_2 (ALFA et al., 2014; DOTTO; WOLFF, 2012). Entretanto, os nutrientes essenciais para as plantas, nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), permanecem em grande parte no efluente, sendo que a disponibilidade destes nutrientes é maior no biofertilizante do que na biomassa. Por exemplo, o efluente possui 25% a mais de NH_4 e N (nitrogênio inorgânico) disponível e um valor de pH mais alto do que o esterco líquido não tratado (ALFA et al., 2014). O processo de digestão anaeróbia promove também redução do teor de metais pesados e de algumas das

possíveis bactérias patogênicas, de maneira que o efluente apresenta maior potencial como fertilizante do solo do que o esterco (MUKHUBA et al., 2018).

Os biofertilizantes apresentam benefícios socioeconômicos e ecológicos para o agricultor, com a melhoria da fertilidade do solo e consequentemente da produção agrícola, e para o ambiente, auxiliando na redução da dependência de insumos externos à propriedade, além de colaborar com a redução da emissão de poluentes no meio ambiente ocasionada pela deposição dos dejetos bovinos (SILVA; ALVES, 2019).

Apesar de todos os benefícios do uso do efluente da biodigestão como biofertilizante anteriormente mencionados, o excesso de fertilizante, independente da origem mineral ou orgânica pode causar impactos ambientais significativos devido ao aumento das perdas de nutrientes do solo e sua transferência para o ambiente. Com isso, limites críticos ambientais são estabelecidos pelos órgãos reguladores e fiscalizadores no intuito de orientar o uso racional dos fertilizantes e de estabelecerem doses máximas aceitáveis ou mesmo proibir a aplicação de qualquer fonte de nutrientes ao solo (NICOLOSO et al., 2019)

Associado a isso, existe preocupação quanto à segurança microbiológica a aplicação dos biofertilizantes ao solo, devido a presença de microrganismos potencialmente patogênicos no efluente (RESENDE et al., 2014). Contudo, o risco de contaminação e a segurança microbiológica irão depender, em grande parte, da capacidade de sobrevivência dos microrganismos no ambiente. Essa sobrevivência pode ser dependente das características das diferentes espécies bacterianas e presença de nutrientes (NAG et al., 2019). Além disso, a medida que o efluente é aplicado no solo, a concentração microbiana pode ser diluída. Devido a variação de temperatura, radiação ultravioleta e pH, ocorre decaimento das populações bacterianas, porém o tempo necessário para esta redução a níveis seguros ainda é questionável, junto com o impacto dessa introdução na ecologia microbiana do solo (CLARKE et al., 2017; PEPPER et al., 2008; SAUNDERS et al., 2012).

As taxas de redução dos agentes patogênicos, ou o grau de decomposição, poderão ser utilizados para avaliação da eficácia do processo. Geralmente o perfil da curva de sobrevivência depende das características intrínsecas dos microrganismos testados, bem como outros fatores importantes, incluindo a linhagem, temperatura, condições de aquecimento, atividade de água, pH e nutrientes (SMITH et al., 2005). Assim, estratégias intensivas de manejo precisam ser projetadas para aumentar a eficiência da remoção dos patógenos ao longo do processo de digestão anaeróbica (GURMESSA et al., 2020).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das legislações ambientais cada vez mais restritivas, alternativas para uma destinação ambientalmente adequada para os resíduos de produção das propriedades rurais e das agroindústrias foram evoluindo ao longo das últimas décadas. Neste sentido, é indiscutível que a tecnologia aplicada ao processo de biodigestão anaeróbica a partir da biomassa possui grande potencial para produção sustentável de energia e é um aliado do saneamento ambiental.

O biogás é um combustível com todas as condições técnicas e econômicas para ser explorado no Brasil. As plantas de biogás para fins energéticos em operação no país, no ano de 2019, foram responsáveis pela produção de 1,3 bi Nm^3 ano^{-1}, sendo que as plantas de pequeno porte representaram 78% das unidades em operação. No Brasil, a curva de crescimento do setor de biogás apresenta padrão exponencial, entre o ano de 2018 e 2019, houve crescimento de 31% no número de plantas em operação destinadas à aplicação energética, também foi registrado elevação de 36% na produção de biogás (CIBIOGÁS, 2020). Embora os dados apresentados sejam animadores e alimentem as perspectivas de ampliação da cadeia do biogás no país, cabe dizer que ela ainda está em seu estágio inicial de desenvolvimento (CIBIOGÁS, 2020).

Além do biogás, a biodigestão promove a reciclagem dos resíduos orgânicos como fonte de nutrientes para a agricultura. Corretamente manejado, o biofertilizante constitui uma alternativa técnica e economicamente viável. No entanto, esta prática deve seguir os já estabelecidos princípios fundamentais de manejo de fertilizantes e de fertilidade do solo e também as constantes pesquisas na área. Existe uma preocupação quanto à segurança microbiológica para a aplicação deste biofertilizante, devido à falta de informações sobre o decaimento das populações de microrganismos potencialmente patogênicos presentes no efluente. Segundo Nicoloso et al. (2019), a inobservância destes princípios e o descarte inadvertido destes resíduos é um desperdício de nutrientes tanto do ponto de vista agronômico como econômico e pode promover impactos ambientais.

O tema é importante e requer atenção, como desdobramentos futuros, espera-se aprimoramento das tecnologias no rendimento e na produção de um gás combustível de qualidade aplicável a diferentes situações. Além disso, diante das diversas opções de substratos para produção de biogás, são necessários estudos para avaliar a persistência e distribuição de microrganismos nos efluentes que serão direcionados para os ecossistemas associados.

7 REFERÊNCIAS

ABBASI, T.; TAUSEEF, S. M.; ABBASI, S. A. Anaerobic digestion for global warming control and energy generation — an overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Belfast, v. 16, n. 5, p. 3228- 3242, 2012.

ABDESHAHIAN, P. et al. Potential of biogas production from farm animal waste in Malaysia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Belfast, v. 60, p. 714-723, 2016.

AHMAD, M.; KHAN, A. U. Global economic impact of antibiotic resistance: a review. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Oxford, v. 19, p. 313-316, 2019.

ALFA, M. I. et al. Assessment of biofertilizer quality and health implications of anaerobic digestion effluent of cow dung and chicken droppings**. Renewable Energy**, Lemesos, v. 63, p. 681-686, 2014.

AMANI, T.; NOSRATI, M.; SREEKRISHNAN, T. R. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects—a review. **Environmental Reviews**, New Milford, v. 18, p. 255-278, 2010.

AMARAL, A. C.; STEINMETZ, R. L. R.; KUNZ, A. O processo de biodigestão. In: KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. 1 ed. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019.

ANEEL. Resolução Normativa n° 482, de 17 de abril de 2012. Estabelece as condições gerais para o acesso de microgeração e minigeração distribuída aos sistemas de distribuição de energia elétrica, o sistema de compensação de energia elétrica, e dá outras providências. **Agência Nacional de Energia Elétrica**, Rio de Janeiro, 17 abr. 2012. p. 1.

ANEEL. Resolução normativa nº 687, de 24 de novembro de 2015. Altera a resolução normativa nº 482, de 17 de abril de 2012, e os módulos 1 e 3 dos procedimentos de distribuição – PRODIST. **Agência Nacional de Energia Elétrica**, Brasília, 24 nov. 2015. Seção 1.2, p. 8.

AQUINO, S. F. de; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle**. Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.

BERNDT, A. et al. Técnicas para mensurar emissão de metano em bovinos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE RUMINANTES NO CERRADO, 4. 2018, Uberlândia. **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso (ALICE).** Uberlândia: FAMEV UFU, 2018. v. 4, p. 71-82.

BISWAS, S.; PANDEY, P. K.; FARVER, T. B. Assessing the impacts of temperature and storage on *Escherichia coli, Salmonella*, and *L. monocytogenes* decay in dairy manure. **Bioprocessand Biosystems Engineering**, Garching, v. 39, n. 6, p. 901-913, 2016.

BORGES, A. C. P. et al. Energias renováveis: uma contextualização da biomassa como fonte de energia. **REDE–Revista Eletrônica do Prodema**, Fortaleza, v. 10, n. 2, p. 23-36, 2017.

CAMPOS, A. T.; CAMPOS, A. C.; PIRES, M. Tratamento e reciclagem de águas residuárias em sistema intensivo de produção de leite. **Embrapa Gado de Leite-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, Juiz de Fora, v. 1, p. 1 -10, 2003.

CHEN, Z. et al. Antibiotic resistance genes and bacterial communities in cornfield and pastures oils receiving swine and dairy manures. **Environmental Pollution**, Barking, v. 248, p. 947-957, 2019.

CIBIOGÁS - Centro Internacional de Energias Renováveis. **Nota Técnica: N° 002/2020 – panorama do biogás no Brasil em 2019**. Foz do Iguaçu, 2020. Disponível em: <https://biblioteca.cibiogas.org/biblioteca/notatecnica/pdf/panorama-do-biogas-no-brasil-em-2019.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2020.

CLARKE, R. et al. A quantitative microbial risk assessment model for total coliforms and *E. coli* in surface runoff following application of biosolids to grassland. **Environmental. Pollution**, Barking, v. 224, p. 739-750. 2017.

COLATTO, L.; LANGER, M. Biodigestor–resíduo sólido pecuário para produção de energia. **Unoesc & Ciência–ACET**, Joaçaba, v. 2, n. 2, p. 119-128, 2011.

DIVYA, D.; GOPINATH, L. R.; CHRISTY, P. M. A review on current aspects and diverse prospects for enhancing biogas production in sustainable means. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Belfast, v. 42, p. 690-699, 2015.

DOTTO, R. B.; WOLFF, D. B. Biodigestão e produção de biogás utilizando dejetos bovinos. **Ciências Naturais e Tecnológicas**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 13-26, 2012.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Anuário leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais**. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2019.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. How to feed the World in 2050. In:_____. **Executive summary-proceedings of the expert meeting on how to feed the World in 2050**. Rome: Food and Agriculture Organization, 2009.

FERREIRA, G. C. V.; MIZIARA, F.; COUTO, V. R. M. Pecuária em Goiás: análise da distribuição espacial e produtiva. **REDE-Revista Eletrônica do PRODEMA**, Fortaleza, v. 13, n. 2, p. 21-39, 2020.

FREITAS, F. F. et al. The Brazilian market of distributed biogas generation: overview, technological development and case study. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Belfast, v. 101, p. 146-157, 2019.

GALEANO, E. et al. Valor bruto da produção de 2017 e atualização das estimativas para a produção agrícola de 2018. **Boletim da Conjuntura Agropecuária Capixaba -Incaper**, Vitória, v. 4, n. 15, p. 3-15, 2018.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 17-30.

GUDDA, F. O. et al. Antibiotic-contaminated wastewater irrigated vegetables pose resistance selection risks to the gut microbiome. **Environmental Pollution**, Barking, v. 264, p. 114752, 2020.

GURMESSA, B. et al. Manure anaerobic digestion effects and the role of pre-and post-treatments on veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes removal efficiency. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 721, p. 137532, 2020.

HOLLY, M. A. et al. Greenhouse gas and ammonia emissions from digested and separated dairy manure during storage and after land application. **Agriculture, Ecosystems & Environment,** Nanning, v. 239, p. 410-419, 2017.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatística da produção pecuária: primeiros resultados**. Rio de Janeiro: IBGE, 2020.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa da pecuária municipal**. Rio de Janeiro: Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, 2018. Disponível em: <http.//sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2018>. Acesso em: 19 jul. 2020.

INCAPER. **Pecuária**. Vitória: instituto capixaba de pesquisa, assistência técnica e extensão rural – Incaper. Disponível em: <https://incaper.es.gov.br/pecuaria>. Acesso em: 10 jul. 2020.

KARIM, K. et al. Anaerobic digestion of animal waste: effect of mode of mixing. **Water Research**, Oxford, v. 39, n. 15, p. 3597-3606, 2005.

KUMAR, K. V. et al. A review on production of biogas, fundamentals, applications & its recent enhancing techniques. **Chemical Engineering - Elixir International Journal**, Belfast, v. 57, p. 14073-14079, 2013.

LAU, C. H. F. et al. Impacts of multi-year field exposure of agricultural soil to macrolide antibiotics on the abundance of antibiotic resistance genes and selected mobile genetic elements. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 727, p. 138520, 2020.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Nota técnica:** diagnóstico da expansão da adoção da tecnologia de tratamento de dejetos animais (TDA) no território brasileiro entre 2010 e 2019. Brasília: Governo MAPA, 2019.

MATHIAS, M. C. P. P.; MATHIAS, J. F. C. M. Biogas in Brazil: a governmental agenda. **Journal of Energy and Power Engineering**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 1-15, 2015.

MENDONÇA, H. V. et al. Biofertilizer replace urea as a source of nitrogen for sugar cane production. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 229, n. 7, p. 1-7, 2018.

MENDONÇA, H. V.; OMETTO, J. P. H. B.; OTENIO, M. H. Production of energy and biofertilizer from cattle wastewater in farms with intensive cattle breeding. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 228, n. 72, p. 1-14, 2017.

MUKHUBA, M. et al. Comparative assessment of bio-fertiliser quality of cow dung and anaerobic digestion effluent. **Cogent Food & Agriculture**, Sevilha, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2018.

NAG, R. et al. Anaerobic digestion of agricultural manure and biomass–critical indicators of risk and knowledge gaps. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 690, p. 460-479, 2019.

NGUYEN, L. N.; NGUYEN, A. Q.; NGHIEM, L. D. Microbial community in anaerobic digestion system: progression in microbial ecology. In: BUI, X.T.; CHIEMCHAISRI, C.; FUJIOKA, T. **Water and wastewater treatment technologies**. Singapore: Springer, 2019. p. 331-355.

NICOLOSO, R. S. et al. Uso do digestato como fertilizante. In: KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. 1 ed. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019.

OLIVEIRA, D. E. P. **Estudo de viabilidade da produção de energia elétrica a partir do biogás gerado pela biodigestão de resíduos sólidos orgânicos de uma central de abastecimento paulista**. 2019. 64 f. Dissertação (Mestrado em Cidades Inteligentes e Sustentáveis) - Programa de Mestrado em Cidades Inteligentes e Sustentáveis, Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2019.

PEPPER, I. L. et al. Sustainability of land application of class B biosolids. **Journal of Environment Quality**, Manhattan, v. 37, p. 58-67, 2008.

POBLETE, I. B. S. **Simulação e análise de produção e condicionamento de biogás**. 2019. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

QIAN, Y. et al. Review of the state-of-the-art of particulate matter emissions from modern gasoline fueled engines. **Applied Energy**, Västerås, v. 238, p. 1269-1298, 2019.

RESENDE, J. A. et al. Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. **Bioresource Technology**, New York, v. 153, p. 284-291, 2014.

SANTOS, I. A.; NOGUEIRA, L. A. H. Estudo energético do esterco bovino: seu valor de substituição e impacto da biodigestão anaeróbia. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v. 4, n. 1, p. 41-49, 2012.

SAUNDERS, O. et al. Effect of anaerobic digestion and application method on the presence and survivability of *E. coli* and fecal coliforms in dairy waste applied to soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 223, p. 1055-1063. 2012.

SILVA, V. L.; ALVES, W. C. Análise físico-química de biofertilizante oriundo da decomposição anaeróbica de dejetos bovinos. **Gestão & Tecnologia**, Goiânia, v. 1, n. 28, p. 51–61, 2019.

SMITH, S. R. et al. Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. **Waste Management**, New York, v. 25, n. 4 p. 417–425. 2005.

SOARES, L. H. Análise de projetos e percepção ambiental de discentes da UNIFAL de Poços de Caldas relacionados à biodigestão como alternativa sustentável para resíduos sólidos. **Brazilian Applied Science Review**, São José dos Pinhais, v. 2, n. 2, p. 621-624, 2018.

TEIXEIRA, J. C.; HESPANHOL, A. N. A trajetória da pecuária bovina brasileira. **Caderno Prudentino de Geografia**, Presidente Prudente, v. 2, n. 36, p. 26-38, 2014.

UN DESA - UNITED NATIONS, DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, POPULATION DIVISION. **World Population Prospects 2019: Highlights**. New York: UN DESA, 2019.

VENGLOVSKY, J.; MARTINEZ, J.; PLACHA, I. Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. **Livestock Science**, Villaviciosa, v. 102, n. 3, p. 197-203, 2006.

ZIEMIŃSKI, K.; FRĄC, M. Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: transformations, stages and microorganisms. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 18, p. 4127-4139, 2012.

ISBN: 978-65-86981-09-4