

Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina

Main aspects for the accomplishment of artificial insemination in canine species

Alexandre R. Silva*, Rita de Cássia S. Cardoso, Lúcia D. M. Silva

Laboratório de Reprodução de Carnívoros / PPGCV / UECE, Av. Paranjana, 1700, Itaperi, 60740-000, Fortaleza - Ceará, Brasil

Resumo: A inseminação artificial pode ser utilizada como um meio alternativo na impossibilidade de realização de monta natural ou na utilização de sémen refrigerado ou congelado. Assim, o presente trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão geral acerca dos principais aspectos ligados à aplicação dessa biotécnica na espécie canina. Dentre esses aspectos, pode-se destacar a utilização de sémen fresco, refrigerado e congelado; os diversos métodos descritos para o monitoramento do ciclo éstrico, como a citologia vaginal, vaginoscopia, dosagens hormonais, ultrassonografia e mensuração de resistência elétrica do muco cervical; bem como as vias de inseminação intravaginal e intrauterina. Finalmente, são traçadas considerações sobre a eficiência da inseminação artificial nessa espécie de fisiologia tão particular.

Summary: The artificial insemination can be used as an alternative way when the natural mating cannot be performed or when chilled or frozen semen is used. Thus, the aim of this study is to present a general review about the main aspects for the accomplishment of this biotechnique in canine species. Concerning those aspects, it can stand out the use of fresh, chilled and frozen semen; the several methods described for the estral cycle monitoring, as the vaginal cytology, vaginoscopy, hormone assay, ultrasound and electric resistance measurement of the cervical mucus; as well as the routes of insemination intravaginal and intrauterine. Finally, considerations are made on the efficiency of the artificial insemination in that species of such a peculiar physiology.

Introdução

A inseminação artificial (IA) consiste em, após a obtenção do sémen, depositá-lo no trato genital da fêmea a ser inseminada. Essa técnica pode ser utilizada como um meio alternativo quando da impossibilidade de realização de monta natural, devido a problemas anatômicos, comportamentais e sanitários, ou ainda, quando da utilização de sémen refrigerado ou congelado. Sendo de principal relevância este último, que possibilita a manutenção da capacidade fecundante em animais de alto interesse zootécnico por um espaço indeterminado de tempo, além de resguardar tais ani-

mais do estresse causado pelo seu transporte para fins de acasalamento (Guérin, 1998).

A primeira IA notificada cientificamente foi realizada no final do século XVIII por Spallazani, que utilizou sémen fresco obtido da vagina de uma cadela naturalmente acasalada e depositou-o na vagina de uma outra cadela utilizando uma seringa. Esse procedimento resultou no nascimento de três filhotes após 62 dias (Johnston *et al.*, 2001).

Somente em 1954 foi descrita por Harrop a primeira IA com sémen canino refrigerado a 4 °C. Após 15 anos, Seager (1969) obteve a primeira gestação utilizando sémen canino congelado, resultando no nascimento de dois filhotes. Nos anos 80, estabeleceu-se a utilização do sémen canino fresco ou refrigerado e os resultados têm se aproximado aos obtidos por monta natural. Porém, os resultados obtidos através da IA com sémen canino congelado são ainda bastante heterogêneos (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989; Silva, 1995). Nesse sentido, o presente estudo apresenta uma revisão geral acerca dos principais aspectos ligados à aplicação da IA na espécie canina.

Coleta e análise seminal

De um modo geral, utiliza-se para a inseminação artificial um macho de escolha do proprietário da cadela a ser inseminada. Entretanto, com o surgimento dos bancos de sémen canino, preconiza-se a realização de uma seleção dos animais doadores. Assim, observa-se que esta seleção pode exercer um marcado efeito sobre a fertilidade, tal qual é descrito para outras espécies, visto que existe uma grande variação individual entre os cães (England, 1993). Por essa razão, a seleção de reprodutores deve ser feita através de uma detalhada anamnese, verificando-se o desempenho reprodutivo anterior do macho e problemas de saúde atuais ou prévios. Deve também ser procedido um cuidadoso exame clínico geral e andrológico, que deve incluir a inspeção e palpação dos órgãos reprodutivos, obser-

* Correspondência: Rua Aracati, 69, Benfica, Fortaleza – Ceará, Brasil, 60020 – 240. Telefone: 00 55 85 2214959, e-mail: legio2000@yahoo.com

vando-se principalmente o tamanho e a consistência testicular, visto que cães com espermatogênese anormal frequentemente têm testículos de consistência inferior à normal. Em seguida, deve-se proceder à coleta e avaliação do sêmen e inspeção do comportamento de monta (lívido), podendo ter continuidade com testes hormonais e análises cromossômicas (Christiansen, 1988, Feldman e Nelson, 1996).

O ejaculado canino é naturalmente dividido em três frações distintas (Harrop, 1955). A primeira fração consiste em um fluido claro originado na próstata e supõe-se ser responsável pela limpeza do canal uretral (England e Allen, 1992). A segunda fração, rica em espermatozoides, é de origem testicular e apresenta volume variável conforme o tamanho testicular e a variação individual, possuindo aspecto turvo, leitoso e opalescente (Christiansen, 1988). A terceira fração é o fluido prostático que deve ser claro e facilmente distinguível da fração espermática. Apresenta um grande volume e serve como um meio diluidor natural proporcionando o transporte dos espermatozoides no trato genital da cadela (England e Allen, 1992).

O sêmen é facilmente colhido de cães, em especial daqueles com experiência prévia de acasalamento. A presença de uma cadela em estro pode melhorar a qualidade do ejaculado, particularmente no caso de cães inexperientes ou tímidos. Pode-se ainda congelar zaragatoas impregnadas de secreções vaginais de cadelas em estro (Silva, 2001) ou impregnadas com o feromônio sintético metil- ρ -benzoato (Goodwing *et al.*, 1979), que podem ser passados na região perianal de uma cadela no momento da coleta do sêmen. Assim, o cão irá reagir como se estivesse diante de uma cadela em cio.

Diversos métodos foram descritos para a coleta de sêmen nesta espécie, tais como: massagem digital, uso de vagina artificial, vibrador elétrico e eletroejaculação (Harrop, 1955; Christiansen, 1988). Segundo Boucher *et al.* (1958), a massagem digital permite a obtenção de um sêmen de qualidade superior ao obtido por vagina artificial, sendo que o primeiro método é especialmente confiável mesmo para cães não condicionados. Althouse *et al.* (1991) observaram que a exposição do sêmen fresco às luvas de látex e/ou vinil causa um imediato decréscimo na motilidade espermática, devendo-se evitar tal contato durante a massagem digital, que é hoje o método de eleição para a coleta do sêmen nesta espécie.

A massagem digital consiste em massagear o prepúcio do cão na altura do bulbo cavernoso peniano, até que o animal atinja a ereção parcial. O prepúcio é então retraído para trás do bulbo e o pênis é apertado com moderada pressão, posteriormente ao bulbo (Seager e Fletcher, 1972; Christiansen, 1988). O ejaculado é coletado fracionadamente com o auxílio de um funil de vidro ou plástico que desemboca em tubos graduados (Gill *et al.*, 1970), devendo-se evitar o contato direto entre o pênis e o material de coleta (Seager

e Fletcher, 1972).

A análise padrão da fração espermática do ejaculado é rotineiramente utilizada para avaliar a qualidade do sêmen canino, incluindo a observação do volume, coloração, viscosidade, pH e osmolaridade. A avaliação microscópica do sêmen inclui a observação da concentração e morfologia espermática, bem como a avaliação subjetiva da porcentagem de espermatozoides móveis na amostra (motilidade) e a qualidade dessa motilidade, denominada de vigor (Christiansen, 1988; Feldman e Nelson, 1996; Johnston *et al.*, 2001). Vale salientar que diversos métodos de análise seminal computadorizada (CASA) já foram validados para a espécie canina, entre eles destacam-se o Analisador de Qualidade Espermática (SQA) e o Hamilton Thorn (HTR), os quais permitem uma avaliação objetiva e precisa dos parâmetros microscópicos seminais (Iguer-Ouada, 2001).

Embora a relação entre a motilidade e a capacidade fecundante do espermatozoide canino não esteja totalmente elucidada, a maioria dos pesquisadores ainda utiliza a motilidade como o principal parâmetro para a avaliação do sêmen canino (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997). Assim, uma amostra normal de sêmen deve exibir uma motilidade mínima de 70% (Christiansen, 1988). Em seguida, deve-se avaliar o vigor espermático, que é a qualidade da motilidade exibida pelos espermatozoides móveis, observada em escala que varia de 0 a 5 (Platz e Seager, 1977). Em 1993, Oettlé demonstrou que a morfologia espermática normal em cães estaria melhor correlacionada com a fertilidade após IA, do que a simples observação da motilidade espermática, sendo que haveria um decréscimo nessa fertilidade caso fossem utilizadas amostras de sêmen apresentando morfologia espermática normal inferior a 60%.

Diversos outros métodos foram descritos para a avaliação da qualidade seminal. Dentre estes, podem ser destacados o teste de termorresistência (Ström *et al.*, 1997), o teste hipo-osmótico (England e Plummer, 1993), o teste de capacitação e reação acrossômica *in vitro* (Hewitt e England, 1998), a análise ultra-estrutural (Rodrigues-Martinez *et al.*, 1993) e os testes de incubação com oócitos homólogos ou heterólogos (Mayenco-Aguirre e Perez-Cortéz, 1998; Metcalf, 1999; Larsson e Rodrigues-Martinez, 2000, Mastro-monaco *et al.*, 2002).

Processamento de sêmen

A IA com sêmen fresco oferece taxas de gestação similares às obtidas com a monta natural (Pereira *et al.*, 2001). Entretanto, o sêmen fresco apresenta pouca flexibilidade, devendo ser utilizado em um curto período após sua coleta. Segundo England (1999), caso o volume ou a concentração espermática não seja suficiente para a IA, deve-se realizar uma nova coleta para incrementar a amostra. Por ocasião da IA, é necessário realizar a expansão da fração espermática, a qual é

geralmente realizada adicionando-se o líquido prostático autólogo até ser atingido o volume mínimo desejado (Nothling e Volkmann, 1993; Uchoa *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002a). Entretanto, pode-se também fazer uso de diluidores, como o Tris (Uchoa *et al.*, 2001), água de coco (Pereira *et al.*, 2001), solução salina fisiológica (Silva *et al.*, 2002a) e o leite desnatado (Betini *et al.*, 2001).

Quando não é necessário o emprego imediato do sêmen, sua viabilidade é prolongada através da refrigeração e da adição de diluidores, como o leite desnatado e a glicina-gema (Cunha e Lopes, 1997), o Tris-gema (Stornelli *et al.*, 2001) e a água de coco (Fontenelle *et al.*, 2002). O sêmen refrigerado apresenta maior flexibilidade que o fresco, podendo ser transportado em garrafas térmicas e manter-se viável por um a cinco dias, desde que a temperatura seja mantida em torno de 4 e 5 °C (Province *et al.*, 1984; England e Ponzio, 1996). Recentemente, Iguer-Ouada (2001) obteve êxito ao prolongar a viabilidade do sêmen canino por mais de 20 dias, através da troca do meio diluidor Tris, conferindo uma renovação de substrato energético para as células espermáticas.

O sêmen canino pode ser ainda congelado e armazenado por tempo indeterminado, permanecendo potencialmente fecundante quando reaquecido e utilizado em IA. Desse modo, o sêmen congelado é o que oferece maior flexibilidade de uso, porém é o que sofre as mudanças mais drásticas quanto à sua qualidade pós-descongelamento (Concannon e Battista, 1989). Diversos diluidores são utilizados para a congelamento do sêmen canino, dentre eles podemos destacar a lactose (Seager, 1969), o Tris (Andersen, 1975), o Triladyl (Nothling *et al.*, 1995), o Biociphos W482 e o Laiciphos 478 (Silva, 1995), o diluidor comercializado pelo Cryogenetics Laboratory of New England - CLONE (Ström *et al.*, 1997) e, mais recentemente, um diluidor à base de água de coco (Cardoso *et al.*, 2003). Entretanto, em diversas publicações, o tampão Tris tem-se mostrado superior a outros diluidores, tanto para a refrigeração, quanto para a congelamento, sendo este o diluidor mais utilizado pela maioria dos grupos de pesquisa da atualidade (Farstad, 1996; Silva *et al.*, 2000).

A gema de ovo de galinha é adicionada ao Tris, geralmente na proporção de 20% (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989; Silva *et al.*, 2003), por promover a proteção da célula espermática contra o choque térmico (Watson e Plummer, 1985; Hammerstedt *et al.*, 1990). Dentre os agentes crioprotetores que podem ser utilizados destacam-se o glicerol (Polge *et al.*, 1949), o dimetilsulfóxido (Olar *et al.*, 1989), o metanol (Kim *et al.*, 1994) e o etileno-glicol (Santos *et al.*, 2001). Entretanto, o glicerol (CH₃H₈O₃) é o crioprotetor mais empregado na congelamento de sêmen canino em concentrações variando entre 2 e 8%, dependendo da composição do diluidor utilizado (Ravaszova *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2003). Finalmente, pode-se ainda adicionar ao diluidor a pasta Equex, que é um aditivo comercial

para sêmen, contendo o dodecil-sulfato, o qual possibilita um aumento na resistência aos danos oriundos da congelamento (Rota *et al.*, 1999).

Diversas metodologias têm sido descritas para a congelamento do sêmen canino e variam de acordo com o diluidor e agentes crioprotetores empregados, preconizando o uso de diferentes velocidades de congelamento. Em todas elas, busca-se minimizar o dano causado ao espermatozóide pelo processamento, visando recuperar um máximo possível de espermatozóides viáveis (Ström *et al.*, 1997). Dentre os diversos métodos existentes, o mais usual é o descrito por Andersen (1975), que serve como base para inúmeros estudos onde têm sido realizadas pequenas modificações nesse método, alcançando excelentes resultados *in vitro* (Ström *et al.*, 1997) e *in vivo* (Rota *et al.*, 1999; Tsutsui *et al.*, 2000). Existem também vários protocolos preconizando diferentes temperaturas e velocidades de descongelamento para o sêmen canino. Usualmente, este processo é realizado sob imersão em banho-maria a temperaturas que variam de 37 °C (Linde-Forsberg, 1991) a 75 °C (Olar *et al.*, 1989). Ademais, a armazenagem do sêmen canino pode ser realizada em pastilhas (Battista *et al.*, 1988), tubos de alumínio de 5 mL (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997) ou, preferencialmente, em palhetas (Cardoso *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003).

Monitoramento do ciclo éstrico da cadela

A problemática da obtenção de sucesso através da IA na espécie canina está diretamente ligada às dificuldades concernentes à determinação do momento ideal para inseminação nessa espécie de fisiologia reprodutiva particular. Segundo Concannon *et al.* (1977) a ovulação ocorreria de maneira sincrônica entre 36 e 50 horas após o pique de hormônio luteinizante (LH). Os ovócitos emitidos não estariam ainda maduros, encontrando-se no estado de vesícula germinativa. A maturação seria então concluída dois a três dias mais tarde com a emissão do segundo corpúsculo polar (Holst e Phemister, 1971; Tsutsui, 1989). A partir desse momento, o ovócito seria fecundável, mas a sua sobrevivência parece ser muito curta, de apenas 24 a 48 horas (Concannon e Battista, 1989). O limite máximo de fecundação se encontraria em torno de 6,5 dias depois do pique de LH (Tsutsui, 1989), sendo o período ideal de fecundação entre três e quatro dias depois do pique. No entanto, esses estudos não nos permitem determinar precisamente o momento e o caráter sincrônico da ovulação (Silva, 1995). Devido a essa problemática, segue-se uma abordagem dos diversos métodos descritos para o monitoramento do ciclo éstrico da cadela, visando a determinação do momento ideal para a realização da IA.

Inicialmente, sugere-se a observação das mudanças anatômicas e comportamentais da cadela que ocorrem principalmente durante o proestro, que dura em torno

de 9 dias, caracterizando-se por edemaciação vulvar, associada a uma descarga serosanguinolenta vaginal, em resposta às altas concentrações de estrogênio. Usualmente, nesse momento, a cadela atrai os machos, mas não permite ser acasalada, mantendo a cauda sobre a vulva e demonstrando um comportamento agressivo (Johnston *et al.*, 2001). A fase subsequente é denominada de estro e caracteriza-se pela vulva aumentada e amolecida, diminuição das descargas vaginais e aceitação do acasalamento pelo macho (Allen, 1992), com exibição da vulva através do afastamento da cauda (Uchoa *et al.*, 2001). No início dessa fase, o estrogênio atinge seu pique máximo, a partir do qual inicia seu declínio. Esse pique de estrogênio promove o pique de LH, que por sua vez é responsável pelo desencadear da ovulação, que irá culminar na elevação dos níveis de progesterona (Concannon *et al.*, 1989).

Outro método prático sugerido para o acompanhamento do ciclo estrico da cadela é a associação da observação de suas mudanças comportamentais e anatômicas com a citologia vaginal. Porém, como este método não é muito preciso, ele fica reservado à inseminação artificial com o sêmen fresco. Assim, tal método se baseia na observação do perfil citológico da cadela, o qual sofrerá mudanças bem características de acordo com as fases do ciclo estrico (Schutte, 1967). A inseminação deve ser realizada quando a fêmea estiver receptiva ao macho e apresentar uma citologia com pelo menos 70% de células epiteliais superficiais. No entanto, uma grande parcela de cadelas candidatas a IA com sêmen fresco são justamente aquelas que têm desvio de comportamento, não aceitando a cópula e não manifestando comportamento sexual normal. Nesses casos, o comportamento não pode ser utilizado como guia, ficando a citologia vaginal como método isolado. Essa última é excelente para guiar o veterinário dentro do ciclo estrico da cadela, mas nem sempre é eficaz quando utilizada isoladamente (Silva *et al.*, 2002b). Segundo England e Allen (1989), além da morfologia celular observada através da citologia vaginal convencional, o padrão de cristalização do muco vaginal das cadelas em estro deve também ser observado, uma vez que o mesmo apresentaria alterações de acordo com o aparecimento do pique estrogênico no decorrer do ciclo estrico.

Uma alternativa para aumentar a eficiência na determinação do momento ótimo para IA é o acompanhamento da cadela por vaginoscopia (Lindsay, 1983). Baseando-se nesse método, o momento ideal para a realização da IA seria quando a mucosa vaginal apresentar pregas fortemente angulosas e de coloração pálida (Johnston *et al.*, 2001). Tanto os endoscópios fibro-ópticos, quanto proctoscópios pediátricos, com diâmetro inferior a 12 mm, podem ser utilizados na maioria das cadelas a fim de se visualizar as mudanças na região cranial da vagina. O uso de ambos os instrumentos requer prática e atenção, no intuito de não causar danos à estrutura anatômica da cadela (Burke, 1986).

O método mais eficiente para se determinar o momento ótimo para a IA é através da dosagem de progesterona plasmática, uma vez que a cadela é a única dentre as fêmeas domésticas que apresenta uma evolução da progesteronemia dois a três dias antes da ovulação (Johnston *et al.*, 2001). Os valores de progesterona sérica são inferiores a 1,0 ng/mL durante o anestro e a maior parte do proestro e rapidamente começam a aumentar nas proximidades do pique de LH (Concannon *et al.*, 1989). A dosagem da progesteronemia é hoje uma prática rotineira que pode ser feita com auxílio de kits semiquantitativos comerciais do *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou por laboratórios especializados que fornecem valores quantitativos obtidos por radioimunoensaio (RIA). O RIA é geralmente o mais acurado das duas técnicas, sendo, entretanto, mais caro e requerendo maior tempo de execução (Johnston *et al.*, 2001). Segundo Johnston *et al.* (2001), o momento ideal para a realização da IA seria dois dias após a progesterona ter atingido concentrações entre 4 e 10 ng/mL. Dosagens paralelas de progesterona e hormônio luteinizante (LH) mostraram que o início da elevação significativa da progesteronemia corresponde ao pique do LH, o qual pode ser uma referência importante para definir-se as datas da inseminação, uma vez que a ovulação costuma ocorrer 48 horas após o pique desse hormônio (Guérin, 1998). Atualmente, testes de RIA e ELISA encontram-se comercialmente disponíveis para a dosagem do LH sérico. No entanto, a mensuração desse hormônio apresenta o inconveniente da necessidade de diversas coletas sanguíneas diárias (Johnston *et al.*, 2001).

Hase *et al.* (2000) investigaram o uso da ultrasonografia como método para predizer a ovulação na cadela. Entretanto, a ocorrência da ovulação só foi observada em 54,5% das cadelas estudadas. Por outro lado, Silva *et al.* (1996) já haviam verificado a dificuldade de se determinar a ovulação na cadela por ultrasonografia, em virtude da presença de uma bolsa de tecido conjuntivo circundando o ovário.

Mudanças na resistência elétrica dos fluidos vaginais têm sido utilizadas com sucesso na determinação do momento ideal para a inseminação em Raposas Azuis e Prateadas (Fougner, 1989). Esse método foi também descrito para a espécie canina, tendo sido constatado sucesso, desde que o detector de resistência elétrica seja sempre colocado na mesma posição da vagina da cadela. No entanto, a extensa variação no tamanho da vagina das cadelas nas diversas raças dificulta o procedimento nessa espécie (Johnston *et al.*, 2001).

Vias de inseminação artificial

A IA intravaginal (IAIV) consiste na deposição do sêmen na vagina da cadela e apresenta-se como a via de escolha na maioria dos casos, por ser de fácil execução e por oferecer bons resultados de um modo geral.

Para a IAIV pode-se utilizar uma pipeta rígida de vidro ou plástica, geralmente utilizada para a inseminação de bovinos (Seager e Fletcher, 1972; Seager e Platz, 1977); um pênis artificial, que consiste em um dispositivo plástico preenchido por ar, imitando as dimensões do pênis do cão (Kojima *et al.*, 1996ab) ou a sonda de Osiris (Mialot *et al.*, 1985).

A sonda de Osiris é uma pipeta plástica flexível munida de um pequeno balão inflável na sua extremidade distal, imitando o enchimento dos bulbos erécteis do pênis do cão durante o coito e impedindo o refluxo do sêmen. O balonete evita também o recuo da sonda e estimula o peristaltismo vaginal, tal qual ocorre no coito. Essa sonda realiza a aspersão do sêmen diretamente na porção cranial da vagina (Mialot *et al.*, 1985).

No protocolo clássico de IAIV, recomenda-se a elevação do trem posterior da cadela por 5 a 20 minutos, visando-se evitar o refluxo do sêmen (Seager, 1986). Porém, Pinto *et al.* (1998) observaram que a redução no tempo de elevação do trem posterior de 10 para 1 minuto não compromete a fertilidade, nem a prolificidade das cadelas. Além disso, Tsutsui *et al.* (1989) citam que os espermatozoides caninos conseguem atingir o corno uterino em dois minutos após a deposição vaginal do sêmen.

A IA por via intrauterina (IAIU), que consiste na deposição do sêmen diretamente dentro do útero, fica reservada para casos particulares, onde a via vaginal poderia comprometer os resultados da IA, como, por exemplo, na utilização de um sêmen congelado com baixa qualidade pós-descongelamento (Silva, 1995). Segundo Johnston *et al.* (2001), a IAIU pode ainda ser utilizada como uma alternativa para melhorar as taxas de fertilidade de machos oligospermicos, ou seja, com um baixo número de espermatozoides no ejaculado.

Várias abordagens têm sido realizadas com o intuito de se desenvolver técnicas para a IAIU, na qual a deposição do sêmen é realizada diretamente dentro do útero da fêmea por via transcervical ou através de procedimentos cirúrgicos transabdominais como a laparotomia e laparoscopia.

A IAIU via transcervical não é uma técnica fácil de ser executada e, em alguns casos, a tranquilização do animal pode ser necessária. O cateterismo cervical foi adaptado para a espécie canina a partir de experimentos prévios realizados na raposa azul (Fougner *et al.*, 1973). Na cadela, esta técnica exige destreza do operador devido à anatomia particular do cérvix e à presença da prega médio-dorsal da vagina (Pineda *et al.*, 1973; Linde, 1978; Lindsay, 1983). Assim, para sua execução são utilizados uma bainha plástica e o catéter escandinavo, o qual é transpassado através do cérvix, sendo este palpado por via abdominal, permitindo a deposição do sêmen diretamente no corpo uterino. O catéter escandinavo consiste em um catéter metálico com 0,75 a 1,0 mm de diâmetro, sendo comercializado em três diferentes tamanhos: 20, 30 ou 40 cm (Andersen, 1975).

A IAIU por laparotomia foi desenvolvida no intuito de transpor as dificuldades do cateterismo cervical. No entanto, essa técnica comporta uma intervenção cirúrgica com todos os riscos implícitos. Além disso, uma anestesia profunda poderia interferir na motilidade uterina e na migração oocitária (Tsutsui *et al.*, 1989).

A IAIU por laparoscopia, apesar de ser considerada uma técnica semicirúrgica, tem caráter pouco invasivo e é de rápida execução, uma vez que o sêmen pode ser depositado em apenas um corno uterino, haja vista que os espermatozoides rapidamente migram para o outro corno (Tsutsui *et al.*, 1989). Os resultados obtidos após IAIU por laparoscopia, tanto com sêmen fresco, como com sêmen congelado, têm sido satisfatórios (Silva, 1995).

Em alguns países europeus, a realização de inseminações por métodos cirúrgicos, existindo a possibilidade do procedimento não-cirúrgico, é considerada antiética (Farstad, 2000). Assim, a endoscopia vaginal parece ser o método do futuro para a sondagem do colo uterino, uma vez que ela possui a grande vantagem de possibilitar a visualização da abertura do cérvix sem a necessidade de sedação do animal (Wilson, 1993; Shin *et al.*, 1997). Segundo Wilson (1993), esse método proporcionaria taxas de concepção em torno de 80%, mesmo com a utilização do sêmen congelado. Para sua execução, é utilizado um endoscópio fibro-óptico rígido conectado a uma fonte luminosa e um cateter urinário, sendo necessária a palpação abdominal para auxiliar a guiar tais instrumentos.

Eficiência da inseminação artificial

A IA com sêmen canino fresco, contendo um número adequado de espermatozoides, proporciona resultados de fertilidade similares àqueles obtidos pela monta natural (Pereira *et al.*, 2001; Uchoa *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002a), a qual, segundo Daurio *et al.* (1987), apresenta eficiência em torno de 85% nesta espécie.

No uso do sêmen refrigerado, Pinto *et al.* (1999) obtiveram 90% e 100% de fertilidade em cadelas submetidas a IAIV com sêmen refrigerado por 24 e 48 horas, respectivamente. Mas, segundo Guérin (1998), os resultados são geralmente inferiores àqueles obtidos com o sêmen fresco, sendo obtida uma taxa de fertilidade em torno de 70%. Além disso, o sucesso desse método estaria dependente de uma boa coordenação entre o envio do sêmen e o momento de realização da inseminação.

As taxas de concepção observadas após IA com sêmen congelado são sensivelmente inferiores às obtidas com sêmen fresco (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989). Esse fato é provavelmente devido à viabilidade e fecundidade reduzida dos espermatozoides congelados. Isso pode ser devido ao processo de congelamento e descongelamento, à qualidade do sêmen após congelamento,

aos tipos de meios utilizados, dentre outros fatores. De fato, segundo Concannon e Battista (1989) e Fontbonne e Badinand (1993b), a viabilidade do espermatozóide após descongelamento pode variar de 12 a 24 horas.

Ademais, no uso de sêmen congelado, as taxas de concepção são geralmente mais altas quando o sêmen é depositado no útero, comparado à deposição vaginal (Olar et al., 1989; Concannon e Battista, 1989). Entretanto, Silva (1995) descreve 100% de gestação para a IAIU por laparotomia e a IAIV utilizando-se a sonda de Osíris com o sêmen congelado, o que implica que a própria metodologia de inseminação pode influenciar os resultados. Resultados semelhantes foram também descritos por Fontbonne e Badinand (1993a), os quais encontraram taxa de fertilidade de 52,6% a partir de IAIV com a sonda de Osíris, e 73,6% em IAIU transcervical por cateterismo, não sendo evidenciadas diferenças estatísticas entre os dois métodos.

Com relação ao número de IA, Uchoa et al. (2001) e Silva et al. (2002a) sugerem a realização de duas inseminações, geralmente, com intervalos de 48 horas, utilizando o sêmen a fresco. Esse mesmo número de inseminações é sugerido por Silva (1995) para a utilização de sêmen congelado. Ademais, no uso de sêmen refrigerado por até 11 dias, Iguer-Ouada (2001) obteve 50% de fertilidade após a realização de uma única IA.

O número mínimo de espermatozoides requerido para a IA não está bem estabelecido. Taxas de fertilidade satisfatórias já foram obtidas com doses inseminantes de 35×10^6 espermatozoides móveis após IAIU e de 50×10^6 espermatozoides móveis após IAIV (Wilson, 1993). De um modo geral, a IAIU requer uma menor concentração de espermatozoides por IA do que a técnica de IAIV.

Segundo Guérin (1998), a fertilidade entre as raças é bastante variável, sendo ainda constatado que o número de espermatozoides por ejaculado varia proporcionalmente de acordo com o tamanho do cão. Assim, talvez seja necessário aumentar a dose inseminante para as raças de grande porte, uma vez que esse maior número de espermatozoides poderia estar correlacionado a um maior comprimento do aparelho genital da cadela.

Considerações finais

Apesar da difundida utilização da IA na espécie canina na atualidade, são necessários ainda um maior conhecimento e controle dos fatores que podem influenciar seu sucesso. Assim, diversos estudos continuam a ser conduzidos visando encontrar metodologias de preservação de gametas que permitam uma perda mínima da qualidade seminal, uma maior eficácia na determinação do momento ideal para a inseminação e utilização de uma via eficiente que não traga riscos ao animal.

Entende-se, desse modo, que a IA em cães seria apenas o começo de uma nova era para a reprodução

e otimização do material genético de canídeos domésticos e selvagens, uma vez que as biotecnologias estabelecidas para a espécie canina poderiam servir como base para estudos visando a preservação e difusão do material genético oriundo de canídeos selvagens ameaçados ou em extinção, haja vista a similaridade filogenética entre tais espécies (Wayne e Vila, 2001).

Bibliografia

- Allen, W.E. (1992). Fertility and Obstetrics in the Dog. Blackwell Scientific Publications (Oxford).
- Althouse, G.C., Ko, J.C.H., Hopkins, S.M., Evans, L.E. (1991). Effect of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoal motility. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 199, 227-229.
- Andersen, K. (1975). Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchtygiene*, 10, 1-4.
- Battista, M., Parks, J., Concannon, P. (1988). Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using pipes, lactose, tris or test extenders. *Proceedings 11° International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*, 3, 229.
- Betini, C.M., Moraes, G.V., Rigolon, L.P. (2001). Inseminação artificial de cadelas com sêmen fresco diluído em meios formulados com água de coco e leite em pó desnatado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25 (3), 373-375.
- Boucher, J., Foote, R.H., Kirk, R.W. (1958). The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of sperm reserves. *Cornell Veterinary*, 48, 67-86.
- Burke, T.J. (1986). Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment, Ed. Lea & Febiger (Philadelphia).
- Cardoso, R.C.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. (2003). Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, 59, 743 - 751.
- Christiansen, I.J. (1988). Reprodução no cão e no gato. Editora Manole (São Paulo).
- Concannon, P.W., Hansel, W., McEntee, K. (1977). Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biology of Reproduction*, 17, 604-613.
- Concannon, P.W., McCann, J.P., Temple, M. (1989). Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 39, 3-25.
- Concannon, P.W., Batista, M. (1989). Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy*, 10, 1247-1259.
- Cunha, I.C.N., Lopes, M.D. (1997). Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino, utilizando-se diluidores à base de leite e glicina gema. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 21 (2), 1997.
- Daurio, C.P., Gilman, M.R., Pulliam, J.D., Seward, R.L. (1987). Evaluation of male Beagles and safety of ivermectin. *American Journal of Veterinary Research*, 48, 1755-1760.
- England, G.C.W. (1993). Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47, 243 -255.
- England, G. C. W., Ponzio, P. (1996). Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, 46, 165-171.
- England, G.C.W., Allen, W.E. (1989). Crystallization patterns in anterior vaginal fluid from bitches in oestrus. *Journal of Reproduction and Fertility*, 86, 335-339.

- England, G.C.W., Allen, W.E. (1992). Factors affecting the viability of canine spermatozoa II: Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, 37, 373 – 381.
- England, G.C.W., Plummer, J.M. (1993). Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 261 – 270.
- England, G.C.W. (1999). Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*, 52, 981-986.
- Farstad, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, 42, 251-260.
- Farstad, W. (2000). Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53, 175-186.
- Feldman, E.C., Nelson, R.W. (1996). Canine and feline endocrinology and reproduction. W. B. Saunders Company (Philadelphia).
- Fontbonne, A., Badinand, F. (1993a). Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 325-327.
- Fontbonne, A., Badinand, F. (1993b). Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 531-532.
- Fontenelle, P.S., Cardoso, J.F.S., Cardoso, R.C.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. (2002). Conservação a 5 °C do sêmen canino diluído em água de coco. *Ciência Animal*, 12, 153-156.
- Fougner, J.A., Aamdal, J., Andersen, K. (1973). Intrauterine insemination with frozen semen in the blue fox. *Nordic Veterinary Medicine*, 25, 144-149.
- Fougner, J.A. (1989). Artificial insemination in fox breeding. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 39, 317-323.
- Gill, H.P., Kanfran, C.F., Foote, R.F., Kirk, R.W. (1970). Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen. *American Journal of Veterinary Research*, 31, 1807-1813.
- Goodwin, M., Gooding, K.M., Regnier, F. (1979). Sex pheromone in the dog. *Science*, 203: 559-561.
- Guérin, C. (1998). A inseminação artificial na espécie canina. *A Hora Veterinária*, 105, 25-32.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11, 73-88.
- Harrop, A.E. (1954). Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Veterinary Record*, 110, 194-196.
- Harrop, A.E. (1955). Some observations on canine semen. *Veterinary Record*, 67, 494-498.
- Hase, M., Hori, T., Kawakami, E., Tsutsui, T. (2000). Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis systems in dogs. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 62 (3), 243-248.
- Hewitt, D.A., England, G.C.W. (1998). An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Animal Reproduction Science*, 51, 321-332.
- Holst, P. A., Phemister, R. D. (1971). The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biology of Reproduction*, 5, 194 – 206.
- Iguer-Ouada, M. (2001) *Medically assisted procreation in Canine Species: Analyses and 4 °C preservation of semen*. Tese (Doutorado) Université de Liège, Liège, 219p..
- Ivanova-Kicheva, M.G., Bobadov, N.D., Somlev, B. (1997). Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. *Theriogenology*, 48, 1343-1349.
- Johnston, S.D., Kustritz, M.V.R., Olson, P.N.S. (2001). Canine and feline theriogenology. W.B.Saunders (Philadelphia).
- Kim, Y.J., Park, Y.J., Kim, B.J., Yu, I.J. (1994). Artificial insemination with frozen semen in the dog – simple freezing method using methanol. *Korean Journal of Veterinary Research*, 34(4), 851-855.
- Kojima, Y., Kawakami, W., Shino, M., Ohchi, T. (1996a). A small trial on a new insemination technique with fresh dog semen using the artificial penis. *Journal of Reproduction and Development*, 42 (5), 39-41.
- Kojima, Y., Kawakami, W., Shino, M., Ohchi, T. (1996b). Preliminary test of artificial insemination in the dog – intrauterine transportation of liquid using the artificial penis. *Journal of Reproduction and Development*, 42 (5), 35-38.
- Larsson, B., Rodríguez-Martínez, H. (2000). Can we use in vitro fertilization to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science*, 60-61, 327-336.
- Linde, C. (1978). Transport of radiopaque fluid into the uterus after vaginal deposition in the oestrous bitch. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 19, 463-465.
- Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. (1989). Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 39, 299-310.
- Linde-Forsberg, C. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21 (3), 467-485.
- Lindsay, F.E.F. (1983). The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post-uterine endoscopy. *Journal of Small Animal Practice*, 24, 1-15.
- Mastromonaco, G.F., Hay, M.A., Goodrowe, K.L. (2002). The effect of oocyte storage and Cumulus cell presence on canine zone penetration by domestic dog spermatozoa. *Theriogenology*, 57, 1123-1134.
- Mayenco-Aguirre, A.M., Pérez-Cortés, A.B. (1998). Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology*, 50 (2), 195-204.
- Metcalf, S. (1999). Assisted reproduction in the bitch. Thesis (Master of Sciences). Institute of Reproduction and Development – Faculty of Science, Monash University, Australia, 161p.
- Mialot, J.P., Dumon, C., Cassou, B. (1985). Insémination artificielle chez la chienne: Mise en place de sémence fraîche avec le pistolet souple “Osiris”. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l’Animal de Compagnie*, 20 (3), 213-220.
- Nöthling, J.O., Volkmann, D.H. (1993). Effects of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 335-341.
- Nothling, J.O., Gerstenberg, C., Volkmann, D.H. (1995). Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen – a retrospective study. *Journal of South Africa Veterinary Association*, 66, 49-55.
- Oettle, E.E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 257-260.
- Olar, T.T., Bowen, R.A., Pickett, B.W. (1989). Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, 31, 451-461.
- Pereira, B.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Cardoso, R.C.S., Silva, L.D.M. (2001). Comparação da monta natural e inseminação artificial com sêmen diluído em água de coco em cadelas da raça Boxer. *Ciência Animal*, 11 (2), 97-100.
- Pineda, M.H., Kainer, R.A., Faulkner, L.C. (1973). Dorsal median postcervical fold in the canine vagina. *American Journal of Veterinary Research*, 34, 1487-1491.
- Pinto, C.R.F., Eilts, B.E., Paccamonti, D.L. (1998). The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemina-

- tion in bitches. *Theriogenology*, 50, 301-305.
- Pinto, C.R.F., Paccamonti, D.L., Eilts, B.E. (1999). Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, 52, 609-616.
- Polge, C., Smith, A.U., Parkers, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, 164, 166.
- Platz, C.C., Seager, S.W.J. (1977). Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Laboratory Animal Science*, 27, 1013 – 1016.
- Province, C.A., Amann, R.P., Pickett, B.W., Squires, E.L. (1984). Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5 °C. *Theriogenology*, 22, 409-415.
- Ravaszova, O., Mesaros, P., Cingakova, V., Lukacinova, M. (1996). A study of the properties of dog ejaculate during long-term storage. *Folia Veterinaria*, 40, 95-99.
- Rodrigues-Martinez, H., Ekwall, H., Linde-Forsberg, C. (1993). Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 279-285.
- Rota, A., Iguer-Ouada, M., Versteegen, J., Linde-Forsberg, C. (1999). Fertility after vaginal or intrauterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, 51 (6), 1045-1058.
- Santos, S.E.C., Vannucchi, C.I., Satzinger, S., Visintin, J.A. (2001). Comparação de dois crioprotetores na congelação de sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25(3), 472-473.
- Schutte, A.P. (1967). Canine Vaginal Cytology-II. Cyclic Changes. *Journal of Small Animal Practice*, 8, 307-311.
- Seager, S. W. J., Platz, C. C. (1977). Artificial insemination and frozen semen in the dog. *Veterinary Clinics of North America*, 7, 757-764.
- Seager, S.W.J., Fletcher, W.S. (1972). Collection, storage and insemination of canine semen. *Laboratory Animal Science*, 22, 177-182.
- Seager, S.W.J. (1986). Artificial insemination in dogs. Em: *Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment*, Ed. T.J. Burke. Lea & Febiger, Philadelphia. Pp. 207-210.
- Seager, S.W.J. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *Artificial Insemination Digest*, 17-26.
- Shin, N.S., Moon, Y.S., Chung, D.H., Kim, Y.J. (1997). Artificial insemination with frozen canine semen using vaginal endoscope. *Korean Journal of Veterinary Clinical Medicine*. 14(2), 297-300.
- Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Silva, L.D.M. (2000). Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. *Ciência Rural*, 6, 1021-1025.
- Silva, A.R., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. (2002a). Uso da sonda de Osíris na inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Rottweiler. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 5, 147-149.
- Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Uchoa, D.C., Silva, L.D.M. (2003). Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59, 821-829.
- Silva, L.D.M. (1995) Procréation medicalement assistée dans l'espèce canine. Investigations morpho-fonctionnelles et optimisation des techniques permettant d'arriver à la maîtrise de la reproduction. Tese (Doutorado) Université de Liège, Liège, 173p.
- Silva, L.D.M. (2001). Avanços da inseminação artificial na espécie canina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25 (2), 107-111.
- Silva, L.D.M., Onclin, K., Versteegen, J.P. (1996). Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches by ultrasonography, laparoscopy and hormonal assays. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 37, 4, 313-320.
- Silva, L.D.M., Silva, A.R., Cardoso, R.C.S. (2002b). Inseminação artificial em cães. Em: *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. Eds. P.B.D. Gonsalves, J.R.F. Figueiredo, V.J.F. Freitas. Varela, São Paulo. Pp.69-95.
- Stornelli, M.A., Stornelli, M.C., Arauz, M.S., Savignone, C.A., García, M., De La Sota, R.L. (2001). Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado refrigerado a 4 °C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25 (3), 468-470.
- Ström, B., Rota, A., Linde-Forsberg, C. (1997). In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*. 48, 247-256.
- Tsutsui, T. (1989). Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 39, 269-275.
- Tsutsui, T., Kawakami, E., Murao, I., Ogasa, A. (1989). Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: Observations through uterine fistula. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 51, 560-565.
- Tsutsui, T., Hase, M., Tanaka, A., Fujimura, N., Hori, T., Kawakami, E. (2000). Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of orvus ES paste-supplemented egg yolk Tris-fructose citrate. *Japanese Veterinary Medical Science*, 62, 603-606.
- Uchoa, D.C., Silva, A.R., Silva, T.F.P., Silva, L.D.M. (2001). Inseminação artificial com sêmen a fresco em cadelas da raça Bassethound utilizando a Sonda de Osíris®. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 25 (3), 371-373.
- Watson, P.F., Plummer, J.M. (1985). The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. *Proceedings 1st. International Conference on Deep Freezing of Boar Semen*, 113-117.
- Wayne, R.K., Vila, C. (2001). Phylogeny and origin of the domestic dog. Em: *The genetics of the dog*, Eds. A. Ruvinsky, J., Sampsom, CAB International. Pp. 1-13.
- Wilson, M.S. (1993). Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen, *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47, 307-311.

Crescimento compensatório em bovinos de corte

Compensatory growth in beef cattle

Dorismar David Alves

Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Zootecnia, Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil.

Resumo: O crescimento animal é consequência da multiplicação das células e do aumento de tamanho das mesmas. A ação dos hormônios e de fatores externos, principalmente a alimentação, permite que os indivíduos manifestem a sua herança genética de crescimento. O estresse nutricional, resultante de uma limitação quantitativa ou qualitativa de nutrientes fornecidos pelos alimentos, impede o animal de expressar o seu potencial de crescimento. O crescimento compensatório refere-se ao fenômeno manifestado em animais, que após um período de restrição alimentar suficiente para deprimir o crescimento contínuo, ao acabar a injúria alimentar e reiniciar uma alimentação adequada, apresentam taxa de crescimento acima do normal, em animais da mesma idade e tamanho e em condições similares de ambiente. O animal pode apresentar compensação completa, parcial ou não apresentar compensação, após um período de restrição alimentar. Dentre os fatores mais importantes que influenciam na magnitude do crescimento compensatório, destacam-se a idade do animal no início da restrição, a severidade e a duração do período de estresse nutricional e a natureza da restrição alimentar. Durante o crescimento compensatório, têm sido reportadas na literatura alterações nos animais concernentes à ingestão de nutrientes, tamanho e crescimento dos órgãos internos, exigência de energia, composição corporal e endocrinologia.

Summary: The animal growth is consequence of the increase in number and size of the cells. The action of hormones and external factors, mainly feeding, allows the individuals to manifest their genetic inheritance of growth. The nutritional stress, due a quantitative or qualitative limitation of nutrients supplied by feeding, impedes the animal of expressing its growth potential. The compensatory growth referring to the phenomenon manifested in animals that, after a period of alimentary restriction enough for depress the continuous growth, when the alimentary stress is over and an appropriate feeding restarts, present growth rate above the normal, in animals of the same age and size and in similar conditions of environment. The animal can present complete, partial compensation or do not present any compensation, after a period of alimentary restriction. The age of the animal in the beginning of the restriction, the severity and the duration of the period of nutritional stress and the nature of the alimentary restriction are the most important factors influencing the magnitude of the compensatory growth. Alterations are observed in the animals during the compensatory growth, mainly related with ingestion of nutrients, size and growth of the internal organs, demand of energy, corporal composition and endocrinology.

Introdução

Em regiões onde a parcela mais significativa da exploração de bovinos ocorre em condições de pastagens, a sazonalidade de produção qualitativa e quantitativa das forrageiras predispõe os animais a desempenhos intermitentes. Este é o grande entrave da natureza imposto à exploração de bovinos em condições de pastagens.

Diversas são as práticas que buscam contornar as consequências da sazonalidade de produção das forrageiras, desde o armazenamento das mesmas na forma de silagens ou fenos, até a suplementação alimentar racional dos animais, em períodos estratégicos.

As práticas concernentes à suplementação nutricional dos bovinos em pastejo devem ser fundamentadas em preceitos que possibilitem o incremento do consumo de matéria seca (MS) e que sejam viáveis economicamente. Para atender esses pré-requisitos, há que se maximizar a atividade da microbiota ruminal e conhecer a dinâmica de crescimento dos bovinos. Assim, torna-se imprescindível rever os fatores envolvidos no crescimento animal, a fim de buscar sua exploração em sincronia com a sazonalidade de produção das forrageiras.

Face às considerações feitas, o escopo desta revisão será abordar as bases teóricas do crescimento normal e do crescimento compensatório em bovinos, salientando que o enfoque do trabalho será direcionado apenas aos bovinos de corte e, mais especificamente, aos animais destinados ao abate, tendo em vista que nesta categoria animal não há maiores preocupações relacionadas aos efeitos dos períodos de restrição alimentar sobre a reprodução.

Crescimento normal

O crescimento é um fenômeno biológico complexo, bastante estudado, porém ainda não perfeitamente esclarecido, apresentando magnitude variável. A ação dos hormônios e de fatores externos, principalmente a alimentação, permite que os indivíduos manifestem a

sua herança genética de crescimento.

Crescimento usualmente é definido como aumento de massa tecidual (Di Marco, 1993; Owens, 1993). Por definição, crescimento inclui também deposição de gordura, embora massa muscular seja de interesse primário na produção de carne. Este aumento da massa tecidual ocorre por multiplicação celular (hiperplasia), aumento celular (hipertrofia) ou ainda incorporação de componentes ambientais específicos (ex.: deposição de apatita). Durante o desenvolvimento embrionário, todos os tecidos crescem por hiperplasia, mas, células especializadas de mamíferos, quando maduras, (ex.: nervos, músculo esquelético) perdem a sua capacidade de multiplicação e crescem somente por hipertrofia ou incorporação de células satélites (Allen *et al.*, 1979). Neste sentido, Grant e Helferich (1991) salientaram que, embora a proliferação das células satélites durante o crescimento muscular pós-natal não implique em aumento do número de células musculares, devido à subsequente fusão das células com as fibras musculares existentes, este processo acaba sendo considerado um evento hiperplásico, devido à proliferação de células e aumento no número de núcleos. Segundo Owens (1993), outros tecidos (ex.: células hematopoiéticas, folículos capilares, epitélio gastrointestinal, órgãos do trato digestivo, ectoderma) continuam sua divisão e multiplicação através da vida.

Crescimento líquido é a diferença entre a síntese e degradação do tecido corporal. O animal aumenta de peso, cresce, quando a síntese dos tecidos (anabolismo) excede a degradação dos mesmos (catabolismo), estando as respectivas taxas de síntese e degradação tecidual em função do balanço energético do animal (Di Marco, 1993).

Sob o ponto de vista produtivo, os principais componentes do peso de um animal são os ossos, os músculos, as vísceras e a gordura. O animal cresce ou ganha peso devido ao acúmulo dos respectivos tecidos, respeitando-se um certo padrão de prioridades. Os órgãos e tecidos apresentam diferentes taxas e velocidades de crescimento e maturação, influenciadas pelo nível nutricional. Crescimento inicia-se pelo tecido nervoso, seguido pelo tecido ósseo, muscular e finalmente tecido adiposo. Desta forma a composição corporal muda ao longo do tempo devido as diferenças na velocidade de crescimento e maturação tecidual (Owens, 1993).

O crescimento pré-natal é rápido, ocorrendo a uma taxa exponencial em todas as espécies animais, mas a taxa de crescimento varia entre as espécies, devido a diferenças no tamanho do esqueleto, peso ao nascer e duração da gestação (Grant e Helferich, 1991).

O crescimento do animal após o nascimento (peso em função da idade) pode ser ajustado em uma curva sigmóide, ou seja, o crescimento pós-natal é lento, mas aumenta rapidamente, desacelerando-se a partir da puberdade, até estágios mais avançados, quando a taxa de crescimento é reduzida (Grant e Helferich, 1991).

As razões para a desaceleração pós-puberdade não são bem entendidas. Estudos em culturas de células musculares sugerem ser a inibição do crescimento consequência da limitação de recursos (espaço, suprimento de nutrientes, fatores de crescimento) ou devido ao acúmulo de produtos ou fatores que inibem a divisão celular (Owens, 1993).

As curvas de crescimento de tecidos individuais e órgãos apresentam comportamento sigmoidal, mas as maiores taxas de ganho ocorrem em momentos diferentes, impossibilitando sua superposição. A desaceleração do crescimento ocorre mais precocemente nos órgãos vitais, em seguida, nos ossos e, após, nos músculos, ocorrendo aceleração do crescimento dos tecidos adiposos em estágios mais avançados do crescimento pós-natal (Grant e Helferich, 1991).

Considerando que o desenvolvimento ponderal é consequência do aumento de peso dos tecidos (ósseo, muscular e adiposo) e dos constituintes químicos do corpo (água, proteínas, lipídios, minerais e vitaminas), cada tipo de tecido formado demanda maior ou menor quantidade de determinado nutriente. Na Tabela 1 pode ser verificada a eficiência de deposição de energia, de peso dos componentes químicos e dos diferentes tecidos. Percebe-se que a deposição de proteína é menos eficiente energeticamente, porém é mais eficiente em termos de peso de tecido depositado, uma vez que para cada unidade de ganho de proteína, cerca de três unidades de água são depositadas em associação (Lanna, 1997). Ainda de acordo com a Tabela 1, percebe-se que a deposição de peso na forma de músculo é cerca de quatro vezes mais eficiente que a deposição de tecido adiposo (2,8 g para 0,7 g tecido/10 kcal).

Tabela 1 - Eficiência de deposição de energia, de peso dos componentes químicos e dos diferentes tecidos

Energia Metabolizável Disponível	Ganho		
	Energia	Componentes Químicos	Tecidos
Para deposição de proteína (10 kcal)	3,5 kcal (35%)	0,64 g proteína	2,8 g músculo
Para deposição de lipídio (10 kcal)	6,0 kcal (60%)	0,64 g lipídeo	0,7 g tecido adiposo

FONTE: Lanna (1997).

Crescimento compensatório

As limitações do ambiente determinam a magnitude do crescimento animal, expresso no aumento do tamanho e peso (Ryan, 1990). O estresse nutricional, resultante de uma limitação quantitativa ou qualitativa de nutrientes fornecidos pelos alimentos, impede o animal de expressar o seu potencial de crescimento. A intensidade desse estresse pode causar redução ou até mesmo taxas negativas de crescimento (Hogg, 1991).

Em sistemas de produção de bovinos, baseados exclusivamente em pastagens, o potencial genético de ganho em peso, principalmente de animais de maior

tamanho corporal, nunca é atingido. O máximo ganho em peso vivo diário obtido nessas circunstâncias, corresponde à aproximadamente metade do potencial genético do animal (Mannetje, 1982).

O crescimento compensatório, denominação proposta por Bohman (1955), refere-se ao fenômeno manifestado em mamíferos e aves, que após um período de restrição alimentar suficiente para deprimir o crescimento contínuo, ao acabar a injúria alimentar e reiniciar uma alimentação adequada, apresentam taxa de crescimento acima do normal, em animais da mesma idade e tamanho e em condições similares de ambiente (Doyle e Lesson, 2001). O fenômeno do crescimento compensatório já está incorporado no mercado americano de confinamentos, onde animais com condição corporal melhor têm desconto em relação a animais mais magros, pois os confinadores sabem que o segundo terá um desempenho superior (Sainz, 1998). Apesar disso, ainda falta informação suficiente para incorporar o efeito do crescimento compensatório de maneira eficaz nos modelos de previsão de exigências ou desempenho. O grande problema está na correta identificação de cada fator que o afeta e o entendimento dos processos biológicos que o desencadeia.

Segundo Ryan (1990), o animal pode apresentar compensação completa, parcial ou não apresentar compensação, após um período de subnutrição ou restrição alimentar. No caso de compensação completa, o ângulo de inclinação da curva de crescimento dos animais que passaram por restrição é maior do que o dos animais que não passaram por restrição. Essa compensação na taxa de crescimento pós-restrição, permite que o mesmo peso de abate seja atingido à mesma idade. Na compensação parcial, o ângulo de inclinação da curva de crescimento dos animais que passaram por restrição é maior do que o dos animais que não passaram por restrição, mas não o suficiente para que o mesmo peso de abate seja atingido a uma mesma idade.

Nas regiões tropicais, em sistemas de exploração animal em pastagens, verifica-se a compensação parcial como sendo a mais comum após o período de restrição alimentar. Destarte, ocorre apenas o restabelecimento parcial do peso, ou porque a taxa de ganho não foi adequada, ou o tempo de realimentação não foi suficiente.

O crescimento compensatório parcial tem sido apontado como uma das justificativas para a viabilidade econômica da suplementação de bovinos em pastejo, tendo em vista a exploração da pecuária bovina de ciclo curto. Neste sentido, Euclides *et al.* (1998) ressaltaram a viabilidade econômica da prática de suplementação de bovinos em pastejo, conforme pode ser observado na Tabela 2. A suplementação alimentar, combinada ou não com confinamento, mostrou-se uma atividade economicamente viável, sendo que o tratamento que apresentou maior valor presente líquido foi aquele em que os animais foram suplementados a pasto nas duas estações secas, e o menor pelos animais

Tabela 2 - Ordem da rentabilidade da suplementação de bovinos, considerando ou não o benefício da liberação das pastagens, resultante da redução da idade de abate

Tratamento	Idade de abate (meses)	Mês de abate	Ordem da rentabilidade	
			1ª Situação ^a	2ª Situação ^b
Suplementação na 1ª seca	30,6	Mai	3º	4º
Suplementação na 2ª seca	28,7	Março	2º	3º
Suplementação na 1ª e 2ª seca	26,3	Janeiro	1º	1º
Suplementação na 1ª e confinamento na 2ª seca	22,6	Outubro	4º	2º
Sem suplementação	35,3	Outubro	5º	5º

^a situação na qual o benefício indireto da liberação de pastagens, resultante da redução da idade de abate, não foi considerada nos cálculos da rentabilidade.

^b situação na qual o benefício indireto da liberação de pastagens, resultante da redução da idade de abate, foi considerada nos cálculos da rentabilidade.

FONTE: Euclides *et al.* (1998).

que não receberam qualquer suplementação.

Há que se ressaltar, no entanto, que a situação exposta na Tabela 2 não é dogmática, ou seja, a melhor rentabilidade da suplementação em comparação ao tratamento sem suplementação poderia ser afetada pelo preço dos insumos e pela manipulação dos diversos fatores que podem afetar o crescimento compensatório, principalmente severidade e duração do período de restrição alimentar. Neste sentido, Euclides *et al.* (2001), avaliando o desempenho de novilhos em pastagens de *Brachiaria decumbens* submetidos a diferentes regimes alimentares, concluíram que na avaliação conduzida para o segmento recria/engorda de forma isolada, com preços médios para o boi gordo e preços correntes para a ração, é preferível manter os animais na pastagem, sem qualquer suplementação. Os autores salientaram, no entanto, atentar para as particularidades de tal experimento, bem como para a sensibilidade das alternativas estudadas com relação a variações no preço da ração e do boi. Pequena redução no custo da ração pode tornar a suplementação econômica, o que também poderia ser favorecido pela consideração de um sistema completo envolvendo cria, recria e engorda. Euclides *et al.* (2001) concluíram que os resultados revelaram o risco associado à adoção de inovações, em geral, e à suplementação de bovinos na seca, em particular.

Os resultados contrastantes dos trabalhos de Euclides *et al.* (1998) e Euclides *et al.* (2001), revelam a necessidade de se direcionar esforços de pesquisa no sentido de avaliar o impacto da manipulação dos fatores que afetam o crescimento compensatório sobre a viabilidade das estratégias de suplementação de bovinos de corte em pasto.

Por fim, quando o ângulo de inclinação da curva de

crescimento dos animais que passaram por restrição, é menor ou igual ao dos animais que não passaram por restrição, diz-se que não houve compensação, e o mesmo peso de abate será atingido a idades mais avançadas ou até mesmo não será atingido, dependendo da severidade e extensão da restrição.

Fatores que afetam o crescimento compensatório

Ryan (1990) afirmou que há uma variabilidade das respostas do crescimento compensatório, tendo em vista os diversos fatores que podem estar envolvidos na manifestação do fenômeno. Nicol e Kitessa (1995) ratificaram a afirmação de Ryan (1990), ao examinarem os resultados de 57 publicações sobre o crescimento compensatório em bovinos, avaliando 207 comparações entre grupos submetidos ou não à restrição alimentar.

Dentre os fatores mais importantes que influenciam na magnitude do crescimento compensatório, destacam-se a idade do animal no início da restrição, a severidade e a duração do período de estresse nutricional e a natureza da restrição alimentar.

Idade do animal no início da restrição

Berge (1991) compilou dados de diversos trabalhos onde a idade dos animais variou de 0 a 25 meses, sendo estes divididos em 2 grupos, de acordo com o início da restrição alimentar (antes ou depois dos sete meses). Segundo os autores, o grupo de animais que sofreu restrição durante a fase de amamentação, levou em média 14 a 18 meses para compensar 70-80% no atraso no seu crescimento, enquanto que animais que sofreram restrição após a desmama levaram de 4 a 7 meses para apresentar o mesmo grau de compensação.

De acordo com Ryan (1990), bovinos restringidos nutricionalmente antes de três meses de idade tendem a não apresentar crescimento compensatório, podendo ficar permanentemente raquíticos, não atingindo o mesmo peso à maturidade de animais que não sofreram restrição alimentar. O peso à maturidade pode até ser atingido, porém em idades bem mais avançadas. Até três meses de idade parece ser o período crítico que os bovinos não devem ser restringidos nutricionalmente, tendo em vista o comprometimento das estruturas ósseas e nervosas (Ryan, 1990). Trabalhando com bovinos mestiços antes do desmame, Morgan (1972) percebeu que a tenra idade em que ocorreu a subnutrição, não permitiu a manifestação do crescimento compensatório.

Em contrapartida, a restrição alimentar de animais próximo ao peso adulto, de acordo Ryan (1990), dificilmente é acompanhada de crescimento compensatório completo após o término da restrição, mas o mesmo peso à maturidade dos animais que não foram restringidos nutricionalmente, sempre é atingido, mesmo que em idades avançadas. Esta afirmação de Ryan (1990) é corroborada pelos trabalhos de Wadsworth (1988) e

Nardon *et al.*, citados por Boin e Tedeschi (1997).

A menor eficiência de deposição de peso na forma de gordura, quando comparada com a deposição de músculo, possivelmente seja a explicação para ausência de compensação completa em animais restringidos próximo ao peso adulto, pois requer maior tempo de recuperação dos animais.

Considerando a idade como um fator que afeta o crescimento compensatório, torna-se necessário considerar que animais taurinos (*Bos taurus taurus*) e zebuínos (*Bos taurus indicus*) apresentam diferenças nas taxas de maturação. Desse modo, animais de elevados pesos à maturidade, apesar da baixa taxa de maturação (menor precocidade), apresentam maiores taxas de crescimento (ganho em peso/dia), quando comparados com animais de menores pesos à maturidade. Isto reflete em uma recuperação com rápidas taxas de ganho em peso para os animais de elevado peso adulto, quando comparados com animais muito precoces.

Severidade e duração do período de restrição Alimentar

A severidade da restrição, ou seja, a quantidade de nutrientes que o animal terá disponível no período de restrição, influencia a resposta do animal após o restabelecimento da alimentação normal. A intensidade da restrição está relacionada mais com o tempo de permanência do animal em crescimento compensatório do que com a taxa de compensação (Ryan, 1990).

Apesar de Ryan (1990) afirmar que a taxa de ganho compensatório aumenta, à medida que aumenta a duração da restrição, Wilson e Osbourn (1960) e Fox *et al.* (1972) ressaltaram que o crescimento compensatório pode ser completo, quando os animais são submetidos a períodos curtos ou médios de restrição, sendo que a capacidade de recuperação diminui à medida que a severidade e a duração da restrição são aumentadas. Nicol e Kitessa (1995), em uma extensa revisão bibliográfica, concluíram que a recuperação animal é aparentemente maior, após perda elevada de peso em um período curto, quando comparada à mesma perda ocorrida em um período longo. Parece-nos razoável afirmar que há uma relatividade em quantificar períodos curtos, médios e longos de restrição alimentar, tendo em vista a interdependência destes períodos com os fatores de severidade e natureza da restrição.

Scales e Lewis (1971), trabalhando com novilhos perdendo pesos de 0,08 kg/dia (nível de manutenção) e 0,230 kg/dia (nível de sub-manutenção), observaram que os animais em nível de manutenção apresentaram crescimento compensatório durante 82 dias, tempo menor que os 180 dias obtidos pelos animais mantidos em sub-manutenção.

French e Ledger (1957) e Vilela *et al.* (1972), trabalhando com animais mestiços (Zebu x Taurinos) exclusivamente em condições de pastagens, observaram que a suplementação dos animais, visando atender as exigências de manutenção no período seco do ano, foi a

opção mais interessante economicamente, nas condições estudadas. Neste sentido, Paulino (1982) também sugeriu como benéfica a suplementação que assegure a manutenção de peso dos animais em períodos críticos do ano, prevenindo danos permanentes na atividade fisiológica.

Natureza da restrição alimentar

Segundo Wilson e Osbourn (1960), o crescimento de um animal pode ser retardado se um nutriente qualquer da dieta faltar, principalmente se energia e proteínas estiverem limitando o ganho em peso. Como o animal apresenta pequenas reservas protéicas, a restrição de proteína geralmente promove maiores danos do que a energética. Drouillard *et al.* (1991) observaram uma melhor taxa de crescimento compensatório em animais que passaram por restrição energética, quando comparados com animais que tiveram apenas restrição protéica.

Alterações durante o crescimento compensatório

Segundo Doyle e Lesson (2001), duas teorias tentam explicar o fenômeno do crescimento compensatório. A primeira, proposta por Wilson e Osbourn (1960), relaciona o crescimento compensatório como sendo uma “tentativa” de restabelecimento entre o tamanho corporal e a idade cronológica, sugerindo assim, que o sistema nervoso central, através de respostas hormonais, estaria controlando a taxa de crescimento acelerado após a restrição alimentar. No entanto, Moiser (1986), citado por Doyle e Lesson (2001), afirmou que os mecanismos de percepção da deficiência no tamanho corporal em relação à idade cronológica, não estão elucidados. Assim, Zubair (1994), citado por Doyle e Lesson (2001), sugeriu uma segunda teoria, em que haveria um mecanismo, chamado de “controle periferal”, onde os tecidos controlariam *per se* o tamanho corporal, através do número de células ou conteúdo total de DNA.

As principais alterações durante o crescimento compensatório estão relacionadas com a ingestão de alimentos, tamanho e crescimento dos órgãos internos, exigência de energia, endocrinologia e composição do ganho em peso.

Ingestão de alimentos

Os resultados encontrados na literatura são controversos quanto ao consumo alimentar, após o término da restrição alimentar. Segundo Ryan (1990), há trabalhos em que o consumo aumentou após o restabelecimento da alimentação normal, porém há outros em que não se observaram alterações no consumo. Segundo Hogg (1991), a ingestão de alimentos é variável durante as três a quatro semanas após o período de restrição alimentar.

O NRC (1996), apesar de discutir o efeito da res-

trição alimentar no consumo de alimentos, não inclui no modelo de ingestão nenhum fator para incorporar o efeito do crescimento compensatório.

Sainz (1998) cita que poderia haver relação entre a menor quantidade de tecido adiposo e menor produção de leptina e que níveis mais baixos deste hormônio explicariam uma mudança no ponto de saciedade do animal.

Lawrence e Fowler (1997), baseados em dados de Lawrence e Pearce (1964), sugerem a hipótese que animais provenientes de restrição alimentar têm menor enchimento ruminal para explicar o aumento de ingestão. Para esses autores esse seria o motivo pelo qual animais em compensação tem uma ingestão superior logo no início da realimentação em relação à animais melhor alimentados previamente. Este seria, por sua vez, a razão para os grandes aumento de ganho de peso no período inicial do crescimento da forragem.

Ferrer Cazcarra e Petit (1995) descobriram que a maior ingestão a pasto após período de restrição não foi devido ao aumento do tamanho de bocado, que é linearmente relacionado com peso vivo, mas pela disposição de permanecer na atividade de pastejo por períodos mais longos e aumentar esse período de maneira mais rápida quando comparado a animais sem restrição.

Tamanho e crescimento dos órgãos internos

Os órgãos internos do corpo, principalmente o fígado, rins, coração e trato gastrointestinal, são responsáveis por 40% da energia de manutenção de um animal em jejum (Koong *et al.*, 1985). Percebe-se, assim, uma relação direta entre tamanho de órgãos internos e exigências para manutenção.

De acordo com Winter *et al.* (1976), durante o período de restrição ocorre uma redução no tamanho dos órgãos internos em termos de peso vivo, ou seja, o crescimento dos mesmos, principalmente fígado e intestinos, é mais afetado do que o crescimento do animal como um todo (tendência a crescimento alométrico negativo). No período pós-restricional, ocorre o inverso, com a taxa de crescimento dos órgãos internos maior do que a observada para o animal como um todo (tendência a crescimento alométrico positivo).

Avaliando o ganho compensatório em novilhos originários de rebanhos leiteiros, Guimarães (1999) concluiu que o ganho em peso mais elevado dos animais, após o período de restrição, está em parte associado ao aumento de peso dos órgãos, principalmente fígado e intestino delgado. Ryan (1990) salientou que são necessários 70 a 90 dias para que o trato gastrointestinal e o fígado possam atingir pesos e tamanhos normais após cessação da restrição.

Exigência de energia

A exigência de energia metabolizável para manutenção é reduzida, para os animais na fase de crescimento compensatório, assegurando uma maior disponibili-

dade de energia para o ganho (Hogg, 1991). Possivelmente essa menor exigência para manutenção estaria relacionada diretamente com os tamanhos dos órgãos internos, que se encontram reduzidos nos animais que sofreram restrição.

Mesmo quando os animais mantêm o peso vivo ou ocorre ligeira perda de peso durante o período de restrição alimentar, ainda há uma diminuição do peso e proporção dos órgãos internos, em relação ao peso vivo do animal (Hogg, 1991).

Carstens *et al.* (1988) encontraram exigência de manutenção de 123 kcal/PesoVazio^{0.75} para animais em compensação, contra 140 kcal/PesoVazio^{0.75} para animais sem crescimento compensatório.

Reduções de 18%, 17% e 11,5% na exigência de energia líquida para crescimento (Elg), foram encontradas por Carstens *et al.* (1991), Sainz (1995) e NRC (1984), respectivamente.

O NRC (1996) utiliza-se de fatores empíricos (condição corporal), para prever uma redução de 20% no requerimento de energia para manutenção em animais muito magros, em decorrência de um possível crescimento compensatório. No entanto, Sainz (1998) observou que a restrição no consumo de um alimento de alta qualidade, produziu 17% de redução no requerimento de energia para manutenção, contra 21% de aumento em dietas restringidas pela baixa qualidade da forrageira, ressaltando que é preciso ter cautela na simples aplicação da condição corporal para estimar redução no requerimento de energia para manutenção.

Mudanças endócrinas

Hogg (1991) citou o hormônio de crescimento (HC), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), a insulina e a tiroxina (T₄), como sendo os hormônios mais relacionados com o crescimento compensatório.

O aumento na concentração sanguínea do hormônio de crescimento estimula a produção de IGF-I e esse por sua vez diminui a produção do HC. Para os animais que passaram por restrição alimentar, esta inter-relação parece “desligada” temporariamente, de forma que os níveis de IGF-I permanecem inalterados enquanto os níveis do HC aumentam (Elsasser *et al.*, 1989).

A insulina, cuja principal função é aumentar a permeabilidade da célula à entrada de glicose, tem seu nível abaixo do normal em períodos de subnutrição, sendo que há um aumento significativo, ao final do período de restrição (Hogg, 1991).

Quanto a tiroxina (T₄), hormônio relacionado com a síntese de degradação muscular, tem-se observado que há uma diminuição nos seus níveis durante o período de restrição, aumentando rapidamente com o início da realimentação (Hogg, 1991).

Alterações na composição corporal

A influência do crescimento compensatório sobre a composição do ganho em peso é complexa, sendo os dados de literatura controversos. Tudor *et al.* (1980) e

Abdalla *et al.* (1988) afirmaram que a composição do ganho de animais em crescimento compensatório tem um maior conteúdo de gordura. Carstens *et al.* (1991) afirmaram ser este conteúdo menor e Rompala *et al.* (1985) encontraram o mesmo conteúdo de gordura entre animais em crescimento normal e compensando.

Fox *et al.* (1972) observaram em seus trabalhos, que novilhos realimentados ganharam mais proteína do que os animais controle (aqueles que não sofreram restrição alimentar), durante o crescimento de 260 a 350 kg de PV. Na fase de crescimento (350 a 450 kg de PV), os animais em crescimento compensatório apresentaram maior deposição de gordura em relação aos animais controle. Acima de 450 kg de PV, o crescimento compensatório não alterou a composição do ganho em peso, em relação aos animais controle. Percebe-se assim que o grau de maturidade dos animais, por ocasião do período da restrição alimentar, é um dos principais fatores que afetam a composição do ganho em peso.

Conclusões

A manifestação do crescimento compensatório está na dependência de uma série de fatores e suas interações, o que justifica uma variabilidade muito grande na magnitude da resposta animal frente aos períodos de restrição alimentar. Pesquisas necessitam ser direcionadas no sentido de esclarecer melhor a influência desses fatores e suas interações sobre a manifestação do crescimento compensatório, principalmente quando se considera a viabilidade das estratégias de suplementação em pasto de bovinos destinados ao abate. Essas pesquisas devem possibilitar a criação de modelos mecanísticos que permitam prever com precisão suficiente o crescimento compensatório.

Considerando que existem regiões onde os períodos de estiagens normalmente atingem 7 a 8 meses, comprometendo o desempenho animal, o avanço no conhecimento e manipulação do crescimento compensatório se torna imprescindível, no sentido de fornecer subsídios mais consistentes para se avaliar a viabilidade da incorporação deliberada desse fenômeno às estratégias de exploração em pasto de bovinos de corte. Com este raciocínio, busca-se associar o lucro máximo ao nível de produção ótimo, e não à produção máxima.

Bibliografia

- Abdalla, H.O., Fox, D.J., Thoney, M.L. (1988). Compensatory gain by Holstein calves after underfeeding protein. *Journal of Animal Science*, 66, 2687-2695.
- Allen, R.E., Merkel, R.A., Young, R.B. (1979). Cellular aspects of muscle growth: Myogenic cell proliferation. *Journal of Animal Science*, 49, 115-127.
- Berge, P. (1991). Long-term effects of feeding during calf hood on subsequent performance in beef cattle (a review). *Livestock Production Science*, 28, 179-201.
- Bohman, V.R. (1955). Crecimiento compensatorio de ganado

- bovino - el efecto de la madurez con forraje. *Journal of Animal Science*, 14, 249-255.
- Boin, C. e Tedeschi, L.O. (1997). Sistemas intensivos de produção de carne bovina: II Crescimento e acabamento. In: Peixoto, A.M., Moura, J.C., Faria, V.P. (coord.). *Produção do Novilho de Corte*. Piracicaba: FEALQ, 205-227.
- Carstens, G.E., Johnson, D.E., Ellenberger, M.A., Tatum, J.D. (1988). Energy metabolism and composition of gain in beef steers exhibiting normal and compensatory growth. In: *Energy Metabolism of Farm Animals*, p.131-134. Proc. 11th Symposium EAAP.
- Carstens, G.E., Johnson, D.E., Ellenberger, M.A. e Tatum, J.D. (1991). Physical and chemical components of the empty body during compensatory growth in beef steers. *Journal of Animal Science*, 69, 3251-3264.
- Di Marco, O.N. (1993). *Crecimiento y repuesta animal*. Mar del Plata: Asociación Argentina de Producción Animal, 129p.
- Doyle, F. e Lesson, S. (2001). Compensatory Growth in Farm Animals. Ontario-Canada URL: <http://novusint.com/nups/1096.htm>. Consultado em dezembro de 2001.
- Drouillard, J.S., Ferrell, C.L., Klopfenstein, T.J., Britton, R.A. (1991). Compensatory growth following metabolizable protein or energy restrictions in beef steers. *Journal of Animal Science*, 69, 811-818.
- Elsasser, T.H., Rumsey, T.S., Hammond, A.C. (1989). Influence of diet on basal and growth hormone-stimulated plasma concentrations of IGF-I in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 67, 128-141.
- Euclides, V.P.B., Euclides Filho, K., Arruda, Z.J., Figueiredo, G.R. (1998). Desempenho de novilhos em pastagens de *Brachiaria decumbens* submetidos a diferentes regimes alimentares. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 27, 246-254.
- Euclides, V.P.B., Euclides Filho, K., Costa, F.P., Figueiredo, G.R. (2001). Desempenho de novilhos F1s Angus-Nelore em pastagens de *Brachiaria decumbens* submetidos a diferentes regimes alimentares. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30, 451-462.
- Ferrer Cazcarra, R., Petit, M. (1995). The effect of sward height on grazing behavior and herbage intake of 3 sizes of Charolais Cattle grazing cocksfoot swards. *Animal Science*, 61, 511-518.
- Fox, D.J., Johnson, R.R., Preston, R.L., Dockerty, T.R., Klasterman, E.W. (1972). Protein and energy utilization during compensatory growth in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 34, 310-318.
- French, M.H. e Ledger, H.P. (1957). Live-weight changes of cattle in East Africa. *The Empire Journal of Experimental Agriculture*, 25, 10-18.
- Grant, A.L., Helferich, W.G. (1991). An overview of growth. In: PERSON, A.M, DUTSON, T.R. *Growth regulation in farm animals: Advances in meat research*. v.7. New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1-16.
- Guimarães, R.F. (1999). Ganho de peso, consumo e conversão alimentar, composição corporal e características de carcaça de novilhos mestiços, durante o ganho compensatório. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 111p.
- Hafez, E.S.E. e Dyer, I.A. (1969). *Animal Growth and Nutrition*. 1969. 402p.
- Hogg, B.W. (1991). Compensatory growth in ruminants. In: *Growth regulation in farm animal - advances in meat research*. Corvallis Oregon: Ed. Elsevier, 7, 103-134.
- Koong, L.J., Ferrell, C.L., Nienaber, J.A. (1985). Assessment of interrelationships among levels of intake and production, organ size and fasting heat production in growing animals. *Journal of Nutrition*, 115, 1383-1388.
- Lanna, D.P. (1997). Fatores condicionantes e predisponentes da puberdade e da idade de abate. In: PEIXOTO, A.M., MOURA, J.C., FARIA, V.P. (coord.). *Produção do Novilho de Corte*. Piracicaba: FEALQ, 41-78.
- Lawrence, T.L.J., Fowler, V.R. (1997). *Compensatory Growth*. In: Growth of farm animals. CAB International, 219-246.
- Lawrence, T. L.J., Pearce, J. (1964). Some effects of wintering yearling beef cattle on different planes of nutrition: I. Live-weight gain, food consumption and body measurement changes during the winter period and the subsequent grazing period. *Journal of Agricultural Science*, 63, 5-21.
- Mannetje, L.T. (1982). Problems of animal production from tropical pastures. In: *Nutritional limits to animal production from pastures*. Editor: HACKER, J.B. Farmhand Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux, 67-86.
- Morgan, J.H.L. (1972). Effect of plane of nutrition in early life on subsequent live-weight gain, carcass and muscle characteristics and eating quality of meat in cattle. *Journal Agricultural Science*, 78, 417-23.
- Nicol, A.M. e Kitessa, S.M. (1995). Compensatory growth in cattle - refs. In: PROCEEDINGS OF THE NEW ZEELAND SOCIETY OF ANIMAL PRODUCTION, 1995. *Conference...* New Zealand: Otago University, 55, 157-160.
- NRC - National Research Council (1984). *Nutrients requirements of beef cattle*. 6ed. Washington: National Academy of Sciences. 90p.
- NRC - National Research Council (1996). *Nutrients requirements of beef cattle*. 7ed. Washington: National Academy of Sciences. 244p.
- Owens, F.N., Dubeski, P., Hanson, C.F. (1993). Factors that alter the growth and development of ruminants. *Journal of Animal Science*, 71, 3138-3150.
- Paulino, M.F. (1982). Alguns aspectos da suplementação de bovinos de corte em regime de pastagem, durante a época seca. *Informe Agropecuário*, 8, 53.
- Rompala, R.E., Jones, S.D.M., Buchanan-Smith, J.G., Bayley, H.S. (1985). Feedlot performance and composition of gain of late maturing steers exhibiting normal and compensatory growth. *Journal of Animal Science*, 61, 637-646.
- Ryan, W.J. (1990). *Compensatory growth in cattle and sheep*. In: Nutrition abstracts and reviews (Series B), 50, 653-664.
- Sainz, R.D. (1998). *Crescimento compensatório em bovinos*. In: CBNA - Simpósio Sobre Produção Intensiva de Gado de Corte. Campinas, SP. 22-38.
- Sainz, R.D., De La Torre, F., Oltjen, J.W. (1995). Compensatory growth and carcass quality in growth-restricted and refeed beef steers. *Journal of Animal Science*, 73, 2971-2979.
- Scales, G.H. e Lewis, K.H.C. (1971). Compensatory growth in yearling beef cattle. *Society of Animal Production*, 31, 51-57.
- Trenkle, A. (1974). Hormonal e nutritional interrelationships and their effects of skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 38, 1142-1149.
- Tudor, G.D., Utting, D.W., O'rourke, P.K. (1980). The effect of pre- and post-natal nutrition on the growth of beef cattle. III. The effect of severe restriction in early post-natal life on the development of body components and chemical composition. *Australian Journal Agricultural Research*, 31, 191-204.
- Vilela, H., Gontijo, R.M., Vidigal, G.T. (1972). Estudo comparativo de dois níveis de mistura de concentrados sobre o ganho de peso de novilhas mestiças (H x Z) durante a estação seca e sobre o ganho a pasto na estação "chuvosa" em área de cerrado. *Arquivo da Escola de Veterinária*, 24, 21-25.
- Wadsworth, J. (1988). A note on the effect of dry season feeding treatment on the subsequent growth at pasture during the wet season of Brahman steers. *Animal Production*, 47, 501-504.
- Wilson, P.N. e Osbourn, D.F. (1960). Compensatory growth after under nutrition in mammals and birds. *Biological Reviews*, 35, 324-363.
- Winter, W.H., Tulloh, N.M., Murray, D.M. (1976). The effect of compensatory growth in sheep on empty body weight, carcass weight, carcass weight and the weights of some offal's. *Journal of Agricultural Science*, 87, 433-441.

Irrigação arterial hepática em canídeo

Arterial hepatic blood supply in the dog

Manuela M.R.E. Niza*¹, Cristina L. Vilela¹, António J.A. Ferreira¹, Maria Salomé Gonçalves¹,
João M. Pisco²

¹ CIISA/Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Rua Professor Cid dos Santos 1300-477 Lisboa

² Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Campo dos Mártires da Pátria, n° 130, 1669-056 Lisboa

Resumo: Para o diagnóstico de algumas afecções hepáticas e para uma adequada abordagem cirúrgica, é necessário o conhecimento das estruturas vasculares arteriais. O presente trabalho visou estudar o padrão normal de irrigação arterial hepática em canídeo, recorrendo a técnicas *in vivo* de angiografia selectiva (20 cães adultos) e *post-mortem* de dissecação anatómica (15 cadáveres). Os resultados mostram que, no cão, são frequentes as variações individuais dos vasos intervenientes no suprimento arterial ao fígado. A artéria hepática não é terminal; as variações surgem na sua origem e ao longo do seu percurso, não existindo diferenças substanciais na irrigação hepática propriamente dita. Em animais sãos, é sempre a artéria hepática, por meio dos ramos hepáticos, a responsável pelo suprimento sanguíneo arterial ao fígado, independentemente da sua emergência e ramificações. A bifurcação da artéria celíaca foi a situação mais frequentemente encontrada. A origem, calibre, curso e ramificações da artéria hepática foram constantes em todos os animais. Em relação aos ramos hepáticos, observámos a situação de 1 a 3 ramos, sendo esta a mais frequente. Embora exista um padrão mais frequente de ramificação da artéria hepática, um número apreciável de animais apresenta variações, que deverão ser consideradas no diagnóstico e/ou intervenção cirúrgica em processo hepáticos.

Summary: The knowledge of hepatic arterial vascular structures is essential for the diagnosis of some liver diseases and for surgical decision. The present work aimed at studying the normal arterial blood supply to the liver in dogs, with *in vivo* techniques of selective angiography (20 adult dogs) and *post-mortem* dissection (15 animals). The results show that individual variations of arterial vessels supplying the liver are frequent in the dog. The hepatic artery is not terminal; variations may occur in its origin and along its path, without substantial differences in the arterial hepatic irrigation itself. In healthy animals, the hepatic artery, through the hepatic branches, is always the responsible vessel for the arterial blood supply to the liver, independently of its emergence and ramifications. The bifurcation of the celiac artery was the most common presentation found. The origin, diameter, course and ramifications of the hepatic artery were constant in all animals. Regarding the hepatic branches, we observed the occurrence of 1 to 3 branches, the latter being the most frequent. Although a common pattern of ramification of the hepatic artery was usually observed, a considerable number of animals may present variations, which must be considered in diagnosis and/or surgical intervention.

Introdução

A hepatologia tem vindo a aumentar a sua importância na clínica dos animais de companhia. Para o bom funcionamento do fígado, é imprescindível um adequado suprimento de nutrientes e oxigénio. Estes são veiculados pela artéria hepática e pela veia porta.

A artéria hepática pode ser sede de processos patológicos como aneurisma, estenose, fistulas arteriovenosas ou hematóbilias. Estes processos, apesar de bem documentados no Homem, só recentemente têm vindo a ser reconhecidos no cão. A artéria hepática pode ainda sofrer agressões traumáticas ou iatrogénicas, conducentes a hemorragias significativas, à redução ou mesmo interrupção do fluxo sanguíneo arterial ao fígado. Por outro lado, dever-se-ão ainda considerar as situações em que a interrupção arterial hepática possa ser utilizada como medida terapêutica. A decisão de intervenção terapêutica, cirúrgica ou não, nos casos acima referidos, deverá basear-se no conhecimento profundo sobre a circulação hepática.

No presente trabalho, tentámos esclarecer qual o padrão normal de irrigação arterial hepática em canídeo, recorrendo a técnicas *in vivo* de angiografia selectiva e *post-mortem* de dissecação anatómica.

No cão, a artéria ou tronco celíaco, proveniente da artéria aorta, é normalmente curta e divide-se em 3 ramos: a artéria hepática (a mais cranial e a primeira a deixar a artéria celíaca), a artéria gástrica esquerda e, por último, a artéria esplénica, de situação mais caudal (Schwarze e Schröder, 1970; Nómima Anatómica Veterinária, 1973; Barone, 1976; Evans e deLahunta, 2000). A artéria hepática passa dorsalmente ao piloro, entre a pequena curvatura do estômago e o fígado. Na proximidade do hilo hepático, faz uma inflexão para a direita, de onde parte um número variável de ramos hepáticos. Seguidamente, origina a artéria gástrica direita e termina-se como artéria gastroduodenal. A artéria gástrica direita é um pequeno vaso que se estende desde o piloro ao cárdia, irrigando a pequena curvatura do estômago, e anastomosa-se com a artéria gástrica esquerda. A artéria gastroduodenal, após um

*Correspondência: Telef: 351 213652800, Fax: 351 213652815, e-mail: necas@fmv.utl.pt

breve percurso no qual supre o piloro, divide-se nas artérias gastroepiploica direita e pancreaticoduodenal cranial. A artéria gastroepiploica direita penetra o grande omento e acompanha-o ao longo da grande curvatura do estômago, irrigando estas estruturas. Forma um arco anastomótico com a artéria gastroepiploica esquerda, que é um ramo da artéria esplénica. A artéria pancreaticoduodenal cranial envia ramos pancreáticos para a porção média do pâncreas e um ramo duodenal, que se dirige caudalmente, ao longo do duodeno. Forma um arco anastomótico com a artéria pancreaticoduodenal caudal, que é um ramo da artéria mesentérica cranial.

Embora os autores acima citados descrevam com uniformidade a artéria celíaca e os seus ramos, este vaso apresenta frequentes variações, que podem ocorrer a todos os níveis. Mesmo recorrendo a técnicas de estudo semelhantes, as observações dos diversos autores não são coincidentes. Assim, utilizando a angiografia selectiva, Enge e Flatmark (1972) confirmaram as descrições clássicas, verificando que, na maioria dos canídeos, a artéria celíaca se divide em três ramos: as artérias hepática, esplénica e gástrica esquerda. Apenas ocasionalmente, a artéria gástrica esquerda pode ter origem na artéria esplénica. Constatações semelhantes foram feitas por Sleight e Thomford (1970), utilizando como método de estudo a dissecação necrópsica. Para estes autores, a trifurcação ocorre em 64% dos casos e a bifurcação em 34%; em 2% dos animais foi observada uma variação pouco frequente, que consistia na existência de duas artérias gástricas esquerdas associadas às artérias hepática e esplénica.

A existência de duas artérias gástricas esquerdas, com proveniência da artéria esplénica, foi também referida por Schmidt *et al.* (1980). Estes autores, recorrendo à angiografia, modelos de corrosão e dissecação, verificaram que a terminação mais comum da artéria celíaca é em dois ramos: a artéria hepática e o tronco gastroesplénico; este divide-se subsequentemente, para dar origem às artérias gástrica esquerda e a artéria esplénica. Esta terminação em dois ramos foi encontrada em 66% dos casos, enquanto que a trifurcação clássica em apenas 34%. Os referidos investigadores descrevem ainda uma anomalia pouco frequente, em que a artéria esplénica tinha origem na artéria mesentérica cranial e não na artéria celíaca, como acontece habitualmente.

De acordo com a Nomina Anatómica Veterinária (1973), Barone (1976) e Ghoshal (1986), não existem artérias hepáticas próprias no cão. A artéria hepática, ao passar no hilo do fígado, emite um ramo lateral direito, um ramo medial direito e um ramo esquerdo. Segundo estes autores, a artéria cística tem origem no ramo esquerdo. Já Evans e deLahunta (2000) afirmam que esta artéria provém do último ramo hepático que deixa a artéria hepática, que não é necessariamente o esquerdo. O número de ramos hepáticos descrito pelos diversos autores varia bastante, desde 3 ramos

(Nomina Anatómica Veterinária, 1973; Barone, 1976; Ghoshal, 1986), 2 a 4 ramos (Enge e Flatmark, 1972; Gunn *et al.*, 1986), 1 a 5 ramos (Sleight e Thomford, 1970; Schmidt *et al.*, 1980) a 3 a 6 ramos (Karasewich *et al.*, 1966).

A artéria gástrica direita tem também uma proveniência muito variável. Alguns autores referem a sua origem na artéria gastroduodenal e, ocasionalmente, num dos ramos hepáticos (Enge e Flatmark, 1972). Para outros investigadores, ela origina-se mais frequentemente na artéria lobar medial direita, na artéria gastroduodenal e, excepcionalmente, na artéria hepática (Schmidt *et al.*, 1980). Outros estudos revelaram que a sua proveniência mais frequente é a artéria hepática e, ocasionalmente, os ramos hepáticos (Gunn *et al.*, 1986). Segundo os Tratados de Anatomia (Nomina Anatómica, 1973; Barone, 1976; Evans e deLahunta, 2000), a sua origem é a artéria hepática, após a emergência dos ramos hepáticos.

A dissecação é uma técnica que, desde há muito, vem sendo utilizada no estudo anatómico dos diversos órgãos e sistemas. Apesar de antiga, ainda continua a proporcionar conhecimentos importantes nesta área. Mais recentemente, outros métodos vieram permitir a realização de estudos *in vivo*, completando assim as observações anteriores, efectuadas apenas *post-mortem*. Dentro deste grupo, salientam-se as técnicas de angiografia.

A angiografia consiste na demonstração radiográfica de áreas do sistema circulatório, através da injeção de compostos orgânicos iodados hidrossolúveis num determinado vaso sanguíneo (Douglas *et al.*, 1987). É um importante meio de diagnóstico, indispensável ao estudo da morfologia vascular, normal ou anómala, de um território (Schmidt *et al.*, 1980).

A angiografia selectiva permite uma melhor definição da vascularização de zonas específicas, quando comparada com angiografia não selectiva da mesma área. Nesta, o preenchimento dos vasos mais finos não é constante e existe frequentemente sobreposição dos vasos que suprem o território em estudo. A angiografia celíaca selectiva tem sido amplamente utilizada para avaliação da vascularização arterial hepática no homem (Bessot *et al.*, 1970; Johnsrude *et al.*, 1987). Esta técnica é também de grande utilidade na preparação da cirurgia hepática, pois as variações anatómicas arteriais são muito frequentes no homem e é de grande interesse a sua avaliação pré e pós-cirúrgica (Bengmark e Rosengren, 1970; Kim *et al.*, 1977; Mays *et al.*, 1979; Reuter *et al.*, 1980).

A técnica de angiografia foi descrita, no cão, por Rising e Lewis (1970). Mais tarde, a angiografia abdominal selectiva foi aplicada ao estudo anatómico dos ramos da aorta abdominal nesta espécie por Gomez *et al.* (1973). Estes trabalhos vieram contribuir para a divulgação e posterior utilização desta técnica em medicina veterinária, tanto em termos experimentais como em situações clínicas.

Material e métodos

Angiografia

Nos estudos de angiografia foram utilizados 20 cães adultos, de raça indeterminada, com pesos compreendidos entre 10 e 20 Kg, sendo 12 machos e 8 fêmeas.

Antes da realização da angiografia, os animais foram submetidos a um jejum de 18 horas para sólidos e de 12 horas para líquidos.

A pré-medicação consistiu na administração, por via intramuscular (IM), de sulfato de atropina (0,002 mg/Kg), associada a acetilpromazina (0,1 mg/Kg). A indução anestésica foi feita com tiopental sódico, por via intravenosa (IV), na dose de 25 mg/Kg, e a manutenção com mistura de isoflurano/oxigénio, administrada por intubação endotraqueal em sistema semi-fechado.

Os animais, algaliados, foram colocados em posição ventro-dorsal e a parte medial da coxa direita preparada assepticamente. A maioria das angiografias foram realizadas nesta posição embora, por vezes, também fossem efectuadas angiografias a animais em decúbito latero-lateral.

A técnica de angiografia por nós utilizada baseou-se no método descrito por Gomez *et al.* (1973), com uma modificação introduzida: em lugar da punção da artéria femoral, realizámos a sua abertura, como adiante se descreve.

A artéria femoral, palpável no triângulo femoral, foi exposta por meio de uma incisão da pele com aproximadamente 1,5 a 2 cm, seguida de dissecação romba. Uma vez individualizada a artéria, foram passadas duas laçadas em fio de seda 2-0, distanciadas entre si de 1-1,5 cm. Exerceu-se então uma certa tracção destas laçadas para cima e fez-se uma pequena incisão na parede da artéria. Uma bainha vascular French nº 6 ou 7, de acordo com o calibre do vaso, foi firme mas delicadamente introduzida ao longo do lume da artéria. As laçadas de seda foram então apertadas por meio de um nó, para fixar a bainha vascular.

Através da bainha vascular fez-se deslizar, ao longo da aorta abdominal, de modo fácil e suave, um guia metálico J3-35 (cerca de 15 a 20 cm), até atingir a porção cranial deste vaso. Introduziu-se, então, sobre o guia, um cateter de polietileno nº6 French Cobra I, com 65 cm de comprimento e apenas um orifício na extremidade anterior, ao qual se adaptou uma torneira de duas vias na extremidade posterior. Este cateter foi previamente preenchido com soro fisiológico heparinizado (1.000 UI em 250 ml de soro fisiológico), a fim de prevenir a formação de coágulos sanguíneos.

Os passos seguintes foram efectuados com o auxílio de um aparelho intensificador de imagem (Siremobil 2000, Siemens). Fez-se avançar o cateter sobre o guia metálico, o qual foi mantido estacionário. Quando aquele atingiu a primeira vértebra lombar, presumível origem da artéria celíaca, realizou-se uma radiografia simples do abdómen, a fim de aferir as condições téc-

nicas. Nesta altura, o guia metálico foi removido. Para efectuar a cateterização selectiva da artéria celíaca, realizaram-se pequenas manobras de avanço e recuo do cateter, nos sentidos horário e anti-horário, até se sentir uma discreta resistência a estes movimentos. Fez-se então a injeccção de pequenas quantidades, aproximadamente 2 ml, de meio de contraste (loxitalamato de sódio e de meglumina - Telebrix[®] 38), a fim de confirmar a selectividade da cateterização.

Atingido o objectivo proposto, colocou-se um *chassi* com grelha de 80 linhas sob a região a radiografar. Um volume total de 12 a 15 ml de meio de contraste foi injectado manualmente, ao ritmo de 4 a 5 ml por segundo, realizando-se um disparo único no final da injeccção. Durante todo este processo, injectaram-se frequentemente 2-3 ml de soro fisiológico heparinizado, para evitar a formação de coágulos, tendo o cuidado de remover eventuais bolhas de ar presentes na extremidade do cateter.

Nos casos em que não se conseguiu, ao fim de algumas tentativas, efectuar a cateterização selectiva, recorreu-se a uma aortografia abdominal, para a localização precisa da artéria celíaca e avaliação do ângulo formado pelos dois vasos. O contraste foi injectado 3 a 4 cm acima da presumível origem da artéria celíaca, recorrendo a um cateter Tig-Tail F₆. Uma vez identificada a sua origem, foi então possível a cateterização selectiva.

Concluída a angiografia selectiva da artéria celíaca, aliviou-se a pressão da laçada de seda colocada em situação mais anterior, removeu-se cuidadosamente o cateter da artéria femoral, e rapidamente aumentou-se de novo a pressão na laçada, de modo a não ocorrer hemorragia. O vaso foi suturado por meio de pontos simples, com seda 5-0 ou 6-0, e retiraram-se as laçadas que envolviam a artéria femoral. Por fim, suturou-se a pele com seda 2-0 ou 1-0, também com pontos simples (2 ou 3).

A angiografia selectiva da artéria mesentérica cranial foi efectuada em 10 animais, após cateterização desta na sua origem, 1 a 2 cm caudalmente à da artéria celíaca. A técnica seguida foi a descrita para a angiografia selectiva da artéria celíaca.

Dissecção

Os estudos de dissecação anatómica foram realizados em 15 cadáveres de canídeos, 9 machos e 6 fêmeas, com pesos compreendidos entre 10 e 20 Kg, e idades presuntivas entre 1 e 10 anos. Todos os animais tinham sucumbido devido a patologias médicas ou cirúrgicas variadas, mas sem que estas envolvessem os órgãos abdominais.

Após a colocação dos cadáveres em decúbito dorsal, realizou-se a abertura do abdómen através de uma incisão sobre a linha branca, seguida de outra, logo atrás da última costela, de forma a expor os órgãos abdominais.

Começámos por dissecar a artéria aorta abdominal imediatamente abaixo do diafragma e até à emergência das artérias renais. Seguidamente, dissecámos a artéria celíaca, ao longo do seu percurso, assim como todos os seus ramos. Uma vez terminada a dissecação *in loco*, retirámos em bloco a porção dissecada da artéria aorta abdominal, seus ramos e respectivos órgãos, com o fim de averiguarmos se algum vaso, com outra origem que não a artéria celíaca, se dirigia para o fígado.

Resultados

Angiografia selectiva

As angiografias celíacas selectivas realizadas a 20 cães permitiram o estudo das variações anatómicas arteriais hepáticas.

Em 19 animais, a artéria celíaca teve origem na aorta abdominal, a nível da primeira vértebra lombar, mais frequentemente na sua porção média (13 casos); em 4 casos, originou-se na porção proximal desta e em 2 na distal. Apenas num cão, a artéria celíaca emergiu da aorta a nível do espaço intervertebral T₁₃-L₁. A bifurcação da artéria celíaca em artéria hepática e num tronco gastroesplénico foi encontrada em 13 animais (65%) (Fig. 1). Nos restantes 7 cães (35%), verificou-se a sua trifurcação nas artérias hepática, gástrica esquerda e esplénica (Fig. 2).

A artéria hepática foi, em todos os animais, o primeiro ramo a originar-se da artéria celíaca. Na região do hilo do fígado, observou-se uma inflexão para a

direita e para diante, e desta convexidade saíam 1 a 2 ramos hepáticos, que penetravam no parênquima (Fig. 1). Em 12 animais, verificou-se, ainda na porção recta da artéria hepática, a emergência prévia de um outro ramo hepático, suplementar (Fig. 2). Em seguida, a artéria hepática deu origem à artéria gástrica direita, conforme verificámos em 15 animais. Nos restantes 5 casos, não nos foi possível identificar esta artéria. Nos 20 animais examinados, a artéria hepática terminou na artéria gastroduodenal.

O número de ramos hepáticos emergentes da artéria hepática variou, nos animais estudados, entre 1 e 3 (Fig. 3). Foi encontrado um ramo único em 2 animais (10%), 2 ramos em 6 (30%) e 3 ramos em 12 (60%). Os ramos hepáticos com origem na região do hilo do fígado nasciam próximo uns dos outros. Nos cães que apresentavam 2 ramos hepáticos, estes emergiam da artéria hepática a distâncias variáveis (Fig. 3.b.). Em todos os animais com 3 ramos hepáticos, o primeiro originava-se isoladamente da porção recta da artéria hepática (Fig. 3.c.), pouco antes da sua curvatura para a direita e para diante, local de onde os outros provinham. Em geral, os vasos que tinham origem na convexidade da artéria hepática divergiam em forma de arco, a partir do hilo, e apresentavam um curso tortuoso, com uma redução progressiva de diâmetro, à medida que se iam subdividindo. Nos casos em que foram detectados 3 ramos hepáticos, o primeiro tinha um trajecto mais rectilíneo, dirigindo-se para a região posterior direita do fígado (Fig. 3.c.). Em nenhuma das angiografias efectuadas foi possível demonstrar a vascularização da vesícula biliar.

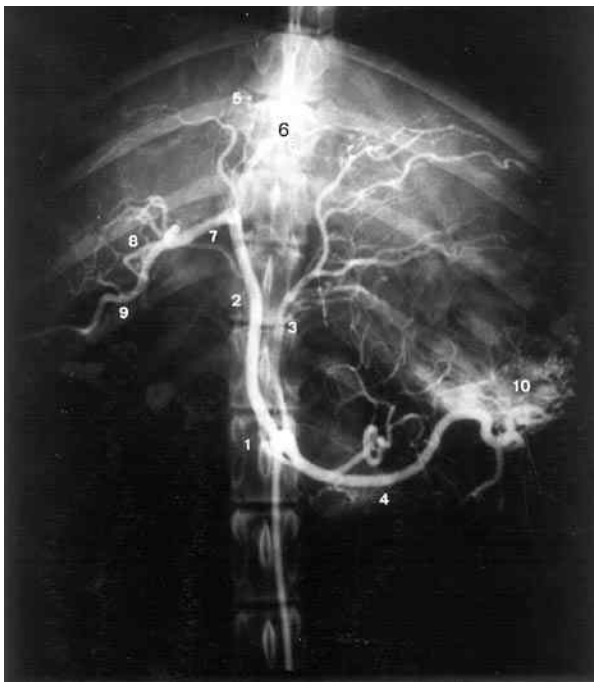


Figura 1 - Ramificações da artéria celíaca: bifurcação (angiografia celíaca selectiva). 1 - Art. celíaca, 2 - Art. hepática, 3 - Art. gástrica esquerda, 4 - Art. esplénica, 5 - ramos hepáticos, 6 - Art. gástrica direita, 7 - Art. gastroduodenal, 8 - Art. gastroepiplóica direita, 9 - Art. pancreaticoduodenal cranial, 10 - Art. gastroepiplóica esquerda



Figura 2 - Ramificações da artéria celíaca: trifurcação (angiografia celíaca selectiva). 1 - Art. celíaca, 2 - Art. hepática, 3 - Art. gástrica esquerda, 4 - Art. esplénica, 5 - Ramos hepáticos, 6 - Art. gástrica direita, 7 - Art. gastroduodenal, 8 - Art. gastroepiplóica direita, 9 - Art. pancreaticoduodenal cranial, 10 - Art. gastroepiplóica esquerda

A artéria gástrica direita foi identificada em 15 dos animais estudados (Fig. 1 e 2). Nos restantes 5 casos, a observação das angiografias não permitiu um reconhecimento preciso quer da sua origem quer do seu trajecto. Sempre que foi possível evidenciá-la, a artéria gástrica direita tinha origem na artéria hepática. Em 5 animais, observou-se a existência de um arco anastomótico entre as artérias gástricas direita e esquerda (Fig. 2).

Nos animais estudados, a artéria hepática continuava-se directamente pela artéria gastroduodenal. Em todas as angiografias, observou-se a sua divisão em dois ramos, as artérias gastroepiplóica direita e pancreatoduodenal cranial (Fig. 1 e 2). Em 12 casos, constatou-se a existência de um arco anastomótico formado pelas artérias gastroepiplóicas direita e esquerda, sendo esta última um ramo da artéria esplénica (Fig. 2).

A artéria esplénica foi o último ramo da artéria celíaca, nos casos em que se observou trifurcação desta. Foi também o vaso que apresentou o segundo maior calibre. Nas situações de bifurcação (13 casos), em que existia um tronco gastroesplénico, era o ramo de maior diâmetro em 10 dos animais. Em 13 cães, verificou-se a existência de um curto tronco gastroesplénico comum, que se continuava pela artéria esplénica e de onde emergia a artéria gástrica esquerda (Fig. 1). Em todos os casos, a artéria esplénica dirigia-se para a esquerda e em direcção caudal. Próximo da região do hilo do baço, dividia-se em dois ramos; um destes penetrava no hilo, subdividindo-se posteriormente em vários ramos terminais para o parênquima esplénico; o outro ramo constituía a artéria gastroepiplóica esquerda. Em 12 dos casos, as angiografias efectuadas mostraram claramente a anastomose deste vaso com a artéria gastroepiplóica direita. Ramos pancreáticos e/ou gástricos, com origem na artéria esplénica, foram ocasionalmente observados, mas a sua identificação precisa foi difícil.

A artéria gástrica esquerda, em 13 dos animais estudados, teve origem na primeira porção da artéria esplénica; nos restantes 7, emergiu directamente da artéria celíaca. O seu trajecto tomou uma direcção cranial e ligeiramente para a esquerda, dividindo-se em numerosos ramos que irrigavam o estômago. Como atrás referido, em 15 animais observou-se uma anastomose entre as artérias gástricas esquerda e direita (Fig. 2). Nos 10 animais em que se realizou a angiografia selectiva da artéria mesentérica cranial, não se observou qualquer ramo desta artéria dirigindo-se para o fígado.

Dissecção

Nos 15 cadáveres, a artéria celíaca teve sempre origem na artéria aorta abdominal, a nível da porção média da primeira vértebra lombar. Em 10 animais (66,7%), a artéria celíaca dividia-se em 2 ramos: artéria hepática e tronco gastroesplénico. Apenas em 5 dos cães em estudo (33,3%), foi observada a trifurca-

ção nas artérias hepática, gástrica esquerda e esplénica.

Os resultados do estudo da dissecção, em relação à emergência e percurso da artéria hepática, coincidiram com os obtidos no estudo angiográfico. Em todos os animais, após a emissão dos ramos hepáticos para o fígado, a artéria hepática dava origem à artéria gástrica direita, terminando-se depois na artéria gastroduodenal.

Os ramos hepáticos, emergentes da artéria hepática e dirigindo-se para o fígado, foram observados em número de 2 em 5 animais (33,3%) e de 3 nos restantes 10 dos cadáveres (66,7%). Nunca foi encontrada a situação de um ramo hepático único. A origem e percurso destes vasos foram semelhantes às observadas no estudo angiográfico. A artéria cística teve origem, em todos os casos, no último dos ramos hepáticos.

Em todos os cadáveres, a artéria gástrica direita teve origem na artéria hepática após a emergência dos ramos hepáticos. A nível do piloro, esta artéria formava um arco anastomótico com a artéria gástrica esquerda.

Em relação à artéria gastroduodenal os resultados observados pela dissecção anatómica foram similares aos do estudo angiográfico. Em todos os casos, foi possível constatar a existência de 2 arcos anastomóticos; um, formado pelas artérias gastroepiplóicas direita e esquerda (ramo da artéria esplénica) e outro pelas artérias pancreatoduodenais cranial e caudal (ramo da artéria mesentérica cranial).

Em 10 dos animais estudados (66,7%), a artéria esplénica teve origem num tronco comum gastroesplénico, enquanto que nos restantes 5 cães (33,3%), em que se verificou a trifurcação da artéria celíaca, a artéria esplénica era o último ramo a emergir daquele vaso. As observações respeitantes ao percurso e divisões desta artéria foram em tudo semelhantes às do estudo angiográfico.

Nos 10 animais em que se observou a bifurcação da artéria celíaca, a artéria gástrica esquerda teve origem na artéria esplénica; nos restantes 5 cães, emergiu directamente da artéria celíaca. Em todos os cadáveres, observou-se o arco anastomótico formado por esta artéria com a artéria gástrica direita.

Nunca foi possível, tanto na dissecção *in loco*, como quando se retirou do cadáver a peça anatómica com os respectivos ramos, constatar a existência de outros vasos dirigindo-se para o fígado, que não os ramos hepáticos provenientes da artéria hepática.

Discussão

A metodologia seguida para o estudo *in vivo* da vascularização arterial hepática foi a angiografia selectiva. Este estudo angiográfico teve como principal objectivo averiguar a eventual existência de um padrão vascular arterial no fígado de cães. Os trabalhos publicados que versam este assunto são escassos e os resultados muitas vezes discordantes e de difícil comparação, visto não haver uniformidade nos protocolos experimentais nem nas técnicas utilizadas.

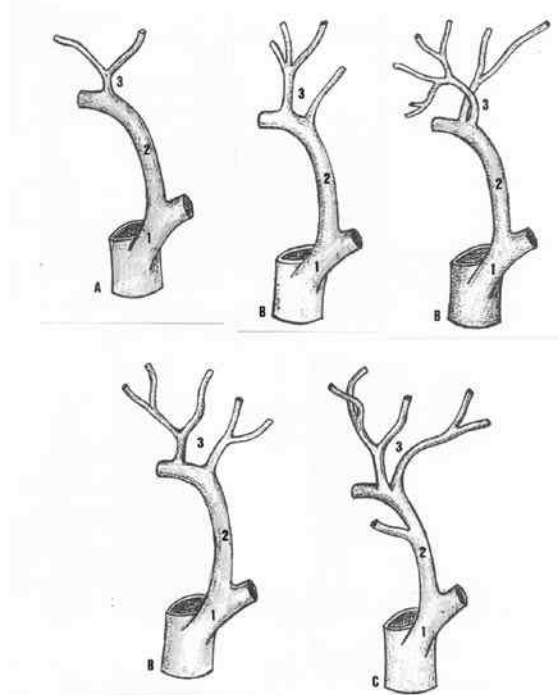


Figura 3 - Variações do número e emergência dos ramos hepáticos. A. Artéria hepática originando um ramo hepático (2 canídeos). B. Artéria hepática originando dois ramos hepáticos, a distâncias variáveis (6 canídeos). C. Artéria hepática originando três ramos hepáticos (12 canídeos). 1 - Artéria celíaca, 2 - Artéria hepática, 3 - Ramos hepáticos.

A técnica de angiografia selectiva revelou-se um método simples, seguro e relativamente rápido que permitiu atingir os objectivos propostos. Para realizarmos a cateterização da artéria hepática, efectuámos um pequeno corte na parede da artéria para a introdução da bainha vascular, e não a punção do vaso, como preconizado por Rising e Lewis (1970) e Gomez *et al.* (1973), que se revelou um método mais seguro, com reduzido dispêndio de tempo e menos desconfortável para o animal que a punção do vaso. A utilização de cateteres heparinizados, com pequenas e frequentes injeções de soro fisiológico, evita a formação de coágulos, ao mesmo tempo que elimina o risco de hemorragias.

O meio de contraste utilizado nestes ensaios foi o Ioxitalamato de sódio e de meglumina (Telebrix[®] 38). Em medicina humana, estão descritas reacções adversas, mais ou menos graves, em 5% dos casos devidas à utilização intravenosa de meios de contraste (Shehadi, 1982). Nenhum dos canídeos por nós estudados apresentou qualquer tipo de complicação. O meio de contraste foi injectado à velocidade aproximada de 4 a 5 ml por segundo. Esta velocidade deve ser a mais aproximada possível da do fluxo sanguíneo na artéria que se pretende opacificar. Uma injeção demasiado lenta leva a um incompleto preenchimento do vaso pelo meio de contraste, devido à hemodiluição, pelo que a opacificação do leito vascular é reduzida. Pelo contrário, uma injeção demasiado rápida conduz ao refluxo

do meio de contraste e preenchimento de outros vasos (Reuter e Redman, 1977). O fluxo sanguíneo deve ser sempre mantido através e em redor do cateter (Johnrude *et al.*, 1987).

Com o fim de complementar as observações angiográficas, recorremos à técnica da dissecação anatómica, o que nos permitiu corroborar os elementos obtidos *in vivo*.

Os resultados obtidos por técnicas de angiografia e de dissecação anatómica poderiam, eventualmente, ser comparados com maior precisão caso os estudos tivessem incidido sobre os mesmos animais. Tal não foi realizado devido a questões de ética associadas às fortes restrições que actualmente existem em relação à experimentação animal.

Nos resultados por nós obtidos, a bifurcação da artéria celíaca foi a situação mais frequentemente encontrada (65% no estudo angiográfico e 66,7% no de dissecação). A trifurcação referida nos Tratados de Anatomia (Schwarze e Schröder, 1970; Nomina Anatómica Veterinária, 1973; Barone, 1976; Ghoshal, 1986; Evans e deLahunta, 2000), foi apenas observada em 35% e 33,3%, respectivamente, dos casos estudados por angiografia e dissecação. Os nossos resultados percentuais estão, no entanto, de acordo com os obtidos por Schmidt *et al.* (1980), que referem, respectivamente, 66% e 34%.

Em relação à artéria hepática, a sua origem, calibre, curso e ramificações foram constantes em todos os animais estudados. O mesmo já não sucedeu em relação aos ramos hepáticos. Os Tratados de Anatomia (Nomina Anatómica Veterinária, 1973; Barone, 1976; Ghoshal, 1986) descrevem apenas 3 ramos, referindo a existência ocasional de variações, não as especificando. A situação de 1 a 3 ramos por nós encontrada no estudo angiográfico, e 2 a 3 no estudo de dissecação anatómica (sendo a existência de 3 ramos a mais frequente), embora não totalmente concordante, enquadra-se nos valores apontados por Enge e Flatmark (1972) e Gunn *et al.* (1986) (2 a 4 ramos), e Sleight e Thomford (1970) e Schmidt *et al.* (1980) (1 a 5 ramos). A situação descrita por Karasewich *et al.* (1966), em que a variação se situava entre 3 e 6 ramos, não foi corroborada pelas nossas observações. Os resultados díspares obtidos pelos diversos autores podem dever-se à utilização de diferentes metodologias de estudo. É também possível que a nossa casuística não tenha sido suficientemente alargada para permitir a detecção de todas as eventuais variações.

A existência de 3 ramos hepáticos foi observada em 60% e 66,7% dos animais, respectivamente no estudo angiográfico e na dissecação, valores próximos dos 64% descritos por Sleight e Thomford (1970). Outros autores referem apenas a variação do número de ramos encontrados, não fazendo qualquer referência ao padrão mais comum (Enge e Flatmark, 1972).

Os resultados por nós obtidos apenas permitem concluir que, embora exista um padrão mais frequente de

ramificação da artéria hepática, um número considerável de animais apresenta variações. As imagens de angiografia não permitiram a definição dos diferentes lobos hepáticos, tornando-se, pois, impossível a determinação exacta do destino de cada uma das artérias lobares provenientes dos ramos hepáticos. Também não foi possível, no decurso do estudo angiográfico, demonstrar a vascularização da vesícula biliar. Este facto deveu-se ao pequeno calibre das artérias que a irrigam e à sobreposição das artérias pancreaticoduodenal, gastroepiplóica e, nalguns casos, gástrica direita.

Nos trabalhos de dissecação, constatou-se que a artéria cística tinha origem no último ramo hepático a emergir da artéria hepática. Esta observação está de acordo com Evans e deLahunta (2000).

Nas angiografias, foi possível a identificação da artéria gástrica direita em 15 dos 20 animais estudados. Este vaso teve sempre como origem a artéria hepática, tanto nas observações angiográficas como de dissecação anatómica.

Os nossos resultados estão de acordo com os Tratados de Anatomia (Nomina Anatómica Veterinária, 1973; Barone, 1976; Evans e deLahunta, 2000). Apesar de ser atribuída a esta artéria uma proveniência muito variável (Enge e Flatmark, 1972; Schmidt *et al.*, 1980), em todos os nossos casos ela teve origem na artéria hepática, após a emergência dos ramos hepáticos. Estes resultados aproximam-se dos de Gunn *et al.* (1986), em que a origem mais frequente da artéria gástrica direita era a artéria hepática, podendo no entanto ter origem nos ramos hepáticos. Apesar de, nas 15 situações do estudo angiográfico em que foi possível definir perfeitamente a artéria gástrica direita, esta provir da artéria hepática, houve um caso (dos 5 em que não conseguimos fazer a identificação exacta), em que a imagem angiográfica sugere a sua origem no ramo hepático esquerdo.

A existência de um tronco gastroesplénico, emergente da artéria celíaca, foi a situação mais frequentemente encontrada nos nossos trabalhos. Esta observação foi também descrita por Enge e Flatmark (1972) e Schmidt *et al.* (1980). Verificámos a existência de um tronco gastroesplénico em 65% e 66,7% dos animais estudados por angiografia e dissecação, respectivamente, valor concordante com os 66% referido por Schmidt *et al.* (1980). Nos animais que não apresentavam um tronco gastroesplénico, a artéria gástrica esquerda emergia directamente da artéria celíaca.

A existência ocasional de 2 artérias gástricas esquerdas (Enge e Flatmark, 1972; Schmidt *et al.*, 1980) não foi por nós observada.

Ao realizarmos angiografias selectivas da artéria mesentérica cranial, tivemos como objectivo verificar se este vaso enviava ramos para o fígado. Esta situação é omissa nos Tratados de Anatomia (Nomina Anatómica Veterinária, 1973; Barone, 1976; Ghoshal, 1986; Evans e deLahunta, 2000) e na maioria dos trabalhos experimentais (Sleight e Thomford, 1970;

Enge e Flatmark, 1972; Gunn *et al.*, 1986). Apenas encontramos duas referências a uma excepção, em que a artéria esplénica tinha origem na mesentérica cranial (Kennedy e Smith, 1930; Schmidt *et al.*, 1980). É interessante que, nos dois casos descritos, ambos os animais em questão apresentavam outras alterações no seu padrão vascular. Assim, parece-nos que são ocorrências muito raras, fazendo parte de um quadro mais vasto de anomalias vasculares.

Podemos assim concluir que, no cão, se encontram frequentemente variações individuais dos vasos intervenientes no suprimento arterial ao fígado. No entanto, o significado funcional destas variações parece-nos pouco relevante. A artéria hepática, no cão, não é terminal; as variações surgem na sua origem e ao longo do seu percurso, mas não existem diferenças substanciais na irrigação hepática propriamente dita. Ou seja, em animais sãos, é sempre a artéria hepática, por meio dos ramos hepáticos, a grande responsável pelo suprimento sanguíneo arterial ao fígado, independentemente da sua emergência e ramificações.

Para além do estudo teórico da anatomia vascular arterial, os resultados obtidos neste trabalho poderão aplicar no campo da cirurgia hepática, quer experimental, quer com fins terapêuticos, assim como na área da radiologia como meio de diagnóstico ou de intervenção. A possibilidade da existência de variações ao padrão de ramificação da artéria hepática deve, assim, ser considerada em todas as situações de aplicação prática dos conhecimentos anatómicos da vascularização arterial hepática.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Doutor José Manuel Martins Gonçalves as suas valiosas sugestões e constante apoio ao longo deste trabalho, e à Dr^a. Cristina Perdigão os seus dotes que permitiram o desenho rigoroso dos modelos anatómicos.

Bibliografia

- Barone, R. (1976). Anatomie Comparée des Mammifères Domestiques. Vol. III - Splanchnologie - Foetus et ses annexes. École Nationale Vétérinaire, Lyon, 507-593.
- Bengmark, S. e Rosengren, K. (1970). Angiographic study of the collateral circulation to the liver after ligation of the hepatic artery in man. *American Journal of Surgery*, 119, 620-624.
- Bessot, M., Fays, J., Piccioli, R., Boileau, F. e Bauquet, J. (1970). Sténoses de l'artère hépatique (4 observations). *Chirurgie (Mémoires de l'Académie. Chirurgicale)*, 96, 457-466.
- Douglas, S.W., Herrtage, M.E. e Williamson, H.D. (1987). Principles of Veterinary Radiography. 4^a edição. Baillière Tindall.
- Enge, I. e Flatmark, A. (1972). Selective coeliac and hepatic artery angiography in normal dogs. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 7, 361-368.
- Evans H.E. e deLahunta, A. (2000). Miller's Guide to the Dissection of the Dog, 5^a edição. W.B. Saunders Company (Filadélfia).
- Ghoshal, N.G. (1986). Coração e artérias do carnívoro. In *Anato-*

- mia dos Animais Domésticos. Sisson e Grossman, 5ª edição.*
Editor: Guetty, R.. Guanabara (Rio de Janeiro), 1497-1550.
- Gomez J.A., Lawson, T.L., Korobkin, M. e Moss, A.A. (1973). Selective abdominal angiography in the dog. *Journal of the American Veterinary Radiology Society*, 14, 72-80.
- Gunn, C., Gourley, R.I. e Koblik, P.D. (1986). Hepatic dearterialization in the dog. *American Journal of Veterinary Research*, 47, 170-175.
- Johnsrude, I.S., Jackson, D.C. e Dunnick, N.R. (1987). *A Practical Approach to Angiography. 2ª edição.* Little Brown and Company.
- Karasewich, E.G., Harper, E.M., Sharp, N.C.C. e Shields, R.S. (1966). Survival of dogs treated with hyperbaric oxygen following hepatic artery ligation. *Surgery*, 59, 255-263.
- Kennedy, H.N. e Smith, A.W. (1930). An abnormal celiac artery in the dog. *Veterinary Record*, 10, 751.
- Kim, D.K., Watson, R.C., Pahnke, L.D. e Fortner, J.G. (1977). Tumor vascularity as a prognostic factor for hepatic tumors. *Annals of Surgery*, 185, 31-34.
- Mays, E.T., Conti, S., Fallahzadeh, H. e Rosenblatt, M. (1979). Hepatic artery ligation. *Surgery*, 86, 536-543.
- Nómina Anatómica Veterinária (1973). 2ª edição. International Committee on Veterinary Anatomical Nomenclature (Viena).
- Reuter, S.R. e Redman, H.C. (1977). *Gastrointestinal angiography. 2ª edição.* W.B. Saunders Company (Filadélfia).
- Reuter, S.R., Palmaz, J.C. e Robert, N.B. (1980). Hepatic artery injury during portacaval shunt surgery. *American Journal of Roentgerology*, 134, 349-353.
- Rising, J.L. e Lewis, R.E. (1970). A technique for arterial catheterization in the dog. *American Journal of Veterinary Research*, 31, 1309-1313.
- Schmidt, S., Lohse, C.L. e Suter, P.F. (1980). Branching patterns of the hepatic artery in the dog: Arteriographic and anatomic study. *American Journal of Veterinary Research*, 41, 1090-1197.
- Schwarze, E. e Schröder, L. (1970). *Compendio de Anatomia Veterinária. Aparato Circulatorio y Piel. Tomo III.* Acribia.
- Shehadi, W.H. (1982). Contrast media adverse reactions: Occurrence, recurrence, and distribution patterns. *Radiology*, 143, 11-17.
- Sleight, D.R. e Thomford, N.R. (1970). Gross anatomy of the blood supply and biliary drainage of the canine liver. *Anatomical Record*, 166, 153-160.

Três casos de neoplasias espontâneas em peixes

Three cases of spontaneous neoplasia in fish

Paula Ramos¹ e Maria da Conceição Peleteiro²

¹Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR/INIAP). Avenida de Brasília. 1449-006 Lisboa.

²Faculdade de Medicina Veterinária (Universidade Técnica de Lisboa). Rua Professor Cid dos Santos. Polo Universitário- Alto da Ajuda. 1300-477 Lisboa.

Resumo: No presente trabalho procede-se à descrição anatómo-histopatológica de casos de neoplasias espontâneas observadas em três espécies de peixes. O exame macroscópico permitiu observar a presença de: 1) massa tumoral distendendo a cavidade abdominal em sardinha (*Sardina pilchardus*) capturada no meio natural, a qual estava intimamente ligada aos cecos pilóricos; 2) pequenas formações tumorais espalhadas pela superfície do corpo de uma carpa de aquário (*Cyprinus japonicus*) e 3) massa neoplásica na comissura superior do opérculo direito de robalo reprodutor (*Dicentrarchus labrax*) mantido em condições experimentais. O exame histopatológico permitiu estabelecer os seguintes diagnósticos para cada um dos casos acima descritos: 1) leiomioma com origem no tecido muscular liso da parede intestinal; 2) melanomas múltiplos da pele e 3) fibropapiloma cutâneo. Em nenhum dos casos descritos foi identificada a presença de metástases.

Summary: In the present work, macro and microscopical description of cases of spontaneous neoplasia in different species of fish are presented. The macroscopical examination registered the presence of: 1) tumoural mass distending the abdominal cavity in sardine (*Sardina pilchardus*) caught in the wild, which was intimately inserted in the wall of the pyloric caecae; 2) small tumours distributed over the body surface of an ornamental carp (*Cyprinus japonicus*) and 3) tumour inserted in the superior insertion of the right operculum in a sea bass (*Dicentrarchus labrax*) kept for breeding in experimental conditions. Histopathology produced the following diagnosis for the three neoplasias: 1) leiomyoma of the muscle layer of the intestinal wall; 2) multiple skin melanomas and 3) skin fibropapilloma. In none of the cases metastases were identified.

Introdução

Os tumores dos peixes tal como os dos vertebrados superiores podem surgir em todos os órgãos e tipos de células (Mawdesley-Thomas, 1975 *cit.* Sinderman, 1990; Noga, 1996). Os tumores da pele são as neoplasias que mais vulgarmente atingem os peixes (Wellings, 1969 *cit.* Smith, 1993), especialmente os papilomas (Schlumberger e Lucké, 1948; Amlacher, 1970; Noga, 1996). Uma das papilomatoses mais frequentemente observada nos teleósteos é a “cauliflower disease” na enguia europeia, *Anguilla anguilla*

L., assim denominada por as lesões apresentarem aspecto de couve-flor (Peters e Peters, 1979; Yokote, 1995). Com algumas excepções, como por exemplo os tumores específicos de espécie como os papilomas epidérmicos dos pleuronectídeos (Sinderman, 1990), a prevalência em números globais é reduzida (Noga, 1996) e a importância económica para a pesca ou piscicultura pouco significativa (Budd e Roberts, 1978). Porém, o estudo das neoplasias nos vertebrados inferiores particularmente nos peixes, mostrou que os tumores destes são morfologicamente semelhantes e, em muitos casos, idênticos aos que ocorrem espontaneamente nos animais superiores, incluindo o homem (Meyers e Hendricks, 1983). Assim, o interesse crescente no estudo dos tumores dos peixes prende-se com o facto destes poderem servir de modelo para ajudar a compreender alterações semelhantes no homem e nos animais, i.e. em termos de oncologia comparada. Um outro aspecto a considerar que justifica o estudo das neoplasias nos peixes é a sua possível interrelação com a poluição e o facto de poderem ser usados como indicadores da existência de carcinogénios ambientais potencialmente perigosos para o homem (Sinderman, 1990). Por último, embora tratando-se de doenças não letais para o peixe, este não é comercializado. Nos peixes, os tumores da pele, sendo visíveis exteriormente, estão entre os mais frequentemente observados, como é o caso dos tumores de células pigmentadas que surgem em várias espécies de peixes ósseos, de viveiro ou selvagens, de que são exemplo o salmão (Bruno e Poppe, 1996) e alguns híbridos (Budd e Roberts, 1978). O mais vulgar é o melanoma, doença genética de carácter hereditária que foi alvo de estudos de genética nos cruzamentos *swordtail-platyfish* (Sobel, *et al.*, 1975; Budd e Roberts, 1978). O registo de tumores musculares em peixes é reduzido em número e pouco conhecido.

Material e métodos

Um exemplar de sardinha (*Sardina pilchardus*) capturado num arrasto de fundo (33 m de profun-

¹Correspondência: pramos@ipimar.pt

²Correspondência: mcpelet@fmv.utl.pt

didade) na costa da Arrifana (Alentejo), uma carpa (*Cyprinus japonicus*) (41,7 cm e 1409 g) proveniente de um aquário de água doce e um robalo reprodutor (*Dicentrarchus labrax*) pertencente a um efectivo de sete exemplares mantidos há mais de dez anos em condições laboratoriais, constituíram o material de estudo. Todos os exemplares foram sujeitos a exame anatómopatológico e as lesões foram registadas. As amostras das massas tumorais foram fixadas em formol salgado a 10% neutralizado. A sardinha foi fixada a bordo. A carpa foi abatida por seccionamento da coluna vertebral e além das massas tumorais colheram-se amostras de órgãos internos. O robalo foi anestesiado com fenoxietanolmonofeniléter e de seguida, procedeu-se à biópsia da massa tumoral. Os tecidos fixados foram desidratados em alcóois de graduação crescente, clarificados em xilol e incluídos em parafina. Cortes com 5µm foram corados com hematoxilina e eosina (H & E). A coloração de Van Gieson foi usada em cortes da massa tumoral da sardinha.

Resultados

A sardinha apresentava o ventre dilatado por uma massa tumoral suficientemente grande para distender a parede abdominal e comprimir as vísceras contra esta (Figura 1). Macroscopicamente, a massa tumoral apresentava consistência firme e não era lobulada. Histologicamente, era constituída por feixes de células fusiformes orientados em diferentes sentidos, em espiral ou entrecruzados. No mesmo corte observaram-se imagens de secções longitudinais, oblíquas e transversais desses feixes celulares (Figura 2). A coloração de Van Gieson evidenciou finas e escassas fibras de colagénio interpostas entre os feixes celulares, confirmando que estes eram constituídos por fibras musculares lisas. As fibras musculares apresentavam-se fusiformes, com núcleo arredondado ou alongado, em forma de bastonete. O tecido era irrigado por vasos capilariformes e também por grandes vasos de paredes espessas. Cortes seriados permitiram estabelecer a origem da neoplasia na camada muscular dos cecos pilóricos. Histologicamente, as células eram idênticas às da musculatura da parede intestinal. Não foram observadas figuras de mitose. A coloração de Van Gieson ao evidenciar escassez de formação de colagénio permitiu confirmar a origem muscular dos feixes celulares. Com base no exame microscópico, o diagnóstico foi leiomioma.

A pele da carpa apresentava inúmeros nódulos, não pedunculados, de tamanho variável, desde alguns pouco visíveis a outros com cerca de 12 mm, de consistência firme e superfície irregular em várias zonas do corpo (cabeça, tronco, barbatanas dorsal e peitorais e processo supra-orbital), sem qualquer simetria na sua distribuição (Figura 3). Alguns apresentavam-se pigmentados de preto. Nódulos de pequenas dimensões encontravam-se implantados no local correspondente à barbatana dorsal, substituindo-a. A imagem histológica obtida permitiu observar a presença de células em



Figura 1 - Exemplar de *Sardina pilchardus*. Massa tumoral distendendo a cavidade abdominal.

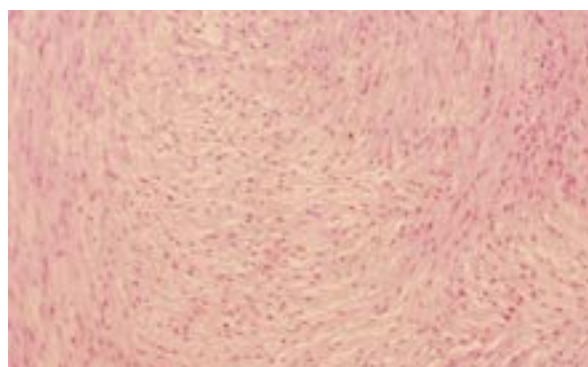


Figura 2 - Leiomioma. Feixes de fibras musculares lisas orientadas em diferentes sentidos. H&E, 50x.



Figura 3 - Exemplar de *Cyprinus japonicus*. Formações nodulares à superfície do corpo.

forma de estrela e outras com aspecto fusiforme, repletas de pigmento melânico, de coloração acastanhada a preta, correspondendo a melanóforos, alguns dos quais apresentando dimensões excepcionais (macromelanóforos) (Figura 4). Estas células encontravam-se dispersas num estroma dérmico rico em células fibroblásticas, entrelaçando as suas projecções dendríticas, junto da membrana basal ou ainda contornando as papilas dérmicas. Observou-se a presença de pequenos grânulos de melanina, de coloração variável, disseminados por toda a massa neoplásica. Não foram observadas metástases nem figuras de mitose. As lesões foram diagnosticadas como melanomas múltiplos da pele.

O robalo reprodutor apresentava uma formação tumoral na comissura superior do opérculo direito (Figura 5). Este nódulo sésil, com cerca de 1 cm de diâmetro tinha superfície irregular, coloração branco opaco raiada de vermelho e consistência mole. Na

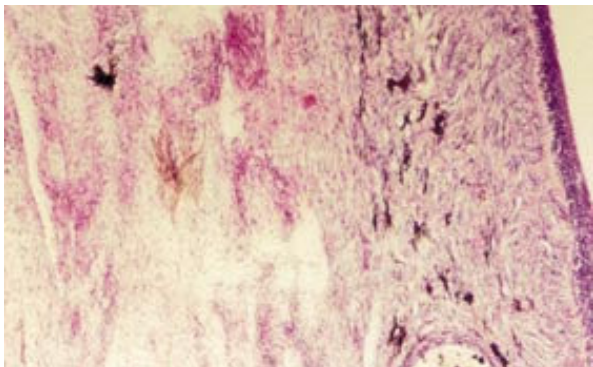


Figura 4 - Corte histológico de um tumor do peixe anterior. Melanóforos e macromelanóforos. H&E, 20x.



Figura 5 - Exemplar de *Dicentrarchus labrax*. Formação nodular na comissura superior do opérculo direito.

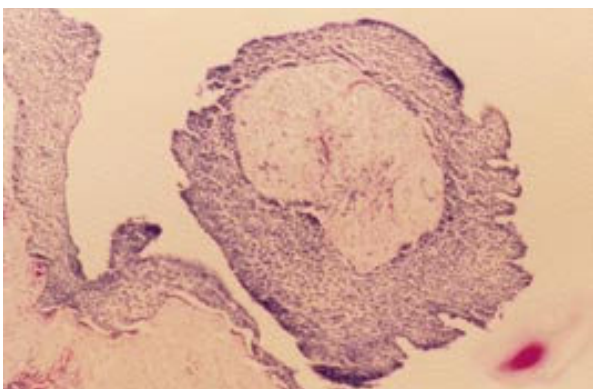


Figura 6 - Corte histológico do tumor da imagem anterior. Observar projecções digitiformes da camada epitelial e o estroma fibrovascular da camada papilar da derme. H&E, 20x.

biópsia ocorreu hemorragia mínima. A imagem histológica permitiu observar hiperplasia do epitélio escamoso estratificado com múltiplas camadas de células epiteliais de aspecto estrelado. A superfície epitelial apresentava zonas de formação de pequenas digitiformes (Figura 6). Observou-se ligeira irregularidade do córion dermoepidérmico. A membrana basal apresentava-se pouco evidente estando ausente em alguns pontos ou difícil de identificar. Não foram observadas células mucosas. Observou-se edema intercelular, espongirose epidérmica, responsável pela separação das células do estrato espinhoso. A derme era constituída por numerosas fibras colagénicas com disposição irregular, bem vascularizada. Os exames anátomo e histopatológico permitiram classificar a formação tumoral como fibropapiloma.

Discussão

A observação macroscópica e o exame histopatológico constituíram os meios de diagnóstico das formações tumorais em estudo.

Casos de leiomiomas em peixes são raros, embora tenham sido registados em algumas espécies, associados a órgãos distintos, tais como a bexiga natatória em *Salmo salar* L. (Bruno e Poppe, 1996), *Carassius auratus* (Mawdesley-Thomas, 1975), gónadas em Yellow perch (Budd *et al.*, 1975), *Mystus seenghala* (Sarkar *et al.*, 1975 *cit.* Mawdesley-Thomas, 1975) e *Protopterus dolloi* (Hubbard e Fletcher, 1985) e barbatanas de Indian catfish (Sarkar *et al.*, 1975 *cit.* Beleau, 1993). O diagnóstico diferencial deverá ser feito relativamente a fibromas. Na sardinha em estudo não foi observada qualquer outra patologia e, embora fosse visível a dilatação abdominal, o seu aspecto era normal e o seu crescimento não parece ter sido comprometido, pois apresentava tamanho idêntico ao dos outros exemplares da amostra e boa condição corporal.

Na carpa, a observação macroscópica dos nódulos não permitiu direccionar o diagnóstico talvez devido ao facto de, segundo Budd e Roberts (1978) as células neoplásicas dos tumores melânicos, na fase inicial poderem ser amelanóticas. Neste caso, foram observados tumores múltiplos. Contudo, por vezes, surge apenas um único nódulo, tal como foi descrito por Freitas e Albuquerque (1982) num melanossarcoma em *Carassius auratus*. Os tumores em geral, e os melanomas em particular, danificam o peixe e depreciam a sua qualidade (Johnstone, 1924; Munday *et al.*, 1998). Tal como descrito em *Carassius auratus* (Freitas e Albuquerque, 1982), em *Cyprinus japonicus*, o comportamento foi comprometido pelo envolvimento das barbatanas. Em ambos os casos, os tumores exibiam melanóforos em diferentes graus de diferenciação, mas na carpa não foi observado carácter invasivo ou destrutivo.

O terceiro caso estudado foi classificado como um fibropapiloma pois trata-se de uma neoplasia em que se observou hiperplasia do epitélio apoiado numa ampla base de derme espessa, enquanto que nos papilomas propriamente ditos observam-se projecções digitiformes ramificadas de múltiplas camadas de células epiteliais suportadas igualmente por estroma de tecido conjuntivo igualmente ramificado, mas sem uma significativa contribuição deste. São exemplo destas neoplasias as observações de Roberts e Bullock (1979) em truta arco-íris, *Salmo gairneri* R. Trata-se geralmente de um tumor único, isolado. Os tumores múltiplos não são raros, tal como foi observado em *Catostomus commersoni* (Smith *et al.*, 1989) e em *Silurus glanus* L. (Obradivic *et al.*, 1983). Neste último, o número de tumores observados em cada peixe, variava de um a seis. Numa outra referência, Anders e Möller (1985) observaram em *Osmerus eperlanus* L. provenientes do rio Elba, que a maioria dos peixes tinha apenas um tumor. Contudo, foram igualmente observados exem-

plares com mais de oito tumores. Segundo Amlacher (1970), esta formação tumoral pode ser classificada de tumor de transição ou misto (Pallaske, 1957), papilomatoso, não lobulado, sem pregas interdigitantes com papilas de tecido conjuntivo que lhe conferiria o aspecto típico de couve-flor observado em *Barbus barbus* (Barnes *et al.*, 1993) e na enguia (Sinderman, 1990). As células mucosas não foram observadas, tal como nos papilomas de outras espécies (Bylund *et al.*, 1980). Noutras situações, quando presentes, encontram-se em número reduzido (Peters e Peters, 1979; Watermann *et al.*, 1987; Bruno e Poppe, 1996), aglomeradas próximo da superfície (Carlisle e Roberts, 1977) ou presentes no centro das pregas papilomatosas (Barnes *et al.*, 1993). Nos papilomas como por exemplo os descritos no salmão, normalmente há pouco envolvimento da derme e a membrana basal está ausente (Bruno e Poppe, 1996) ou é impossível ou difícil de observar (Carlisle e Roberts, 1977). No presente caso, há um evidente comprometimento da derme no processo. O edema intercelular observado no estrato esponjoso foi igualmente descrito em *Salmo gairdneri* (Roberts e Bullock, 1979). A papilomatose é descrita como um processo patológico benigno, proliferativo e de cura espontânea em *Salmo salar*, sendo o estadio final do processo, a cicatrização, caso não haja infecção por *Saprolegnia* sp. ou por outros agentes (Carlisle e Roberts, 1977; Bylund *et al.*, 1980). No robalo em estudo, após um ano, a massa tumoral apresentava o mesmo aspecto e dimensões iniciais o que confirma o carácter benigno da lesão.

Agradecimentos

As autoras agradecem aos colegas Maria Alice Ramos e Alexandre Morais, a cedência dos exemplares estudados e a Augusta Moledo, Constança Pasadas e Rui Silva, a colaboração prestada na execução do trabalho.

Bibliografia

- Amlacher, E. (1970). Viral and Bacterial Diseases. In: *Textbook of Fish Diseases*. Translated by Conroy e Herman. T.F.H. Publications Inc., New Jersey, U.S.A., 81-156.
- Anders, K. e Möller, H. (1985). Spawning papillomatosis of smelt, *Osmerus eperlanus* L., from the Elbe estuary. *Journal of Fish Diseases*, 8, 233-235.
- Barnes, A., Owen, A. G., Feist, S. W. e Bucke, D. (1993). An Investigation into the occurrence of Epidermal Hyperplasia and Papilloma in Barbel (*Barbus barbus* L.) from a River in Southern England. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 13(4), 115-118.
- Beleau, M. H. (1993). Neoplasias of Catfishes. In: *Fish Medicine*. Editor: M. K. Stoskopf. W. B. Saunders Company, pp 531.
- Bruno, D. W. e Poppe, T. T. (1996). Tumours. In: *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*. Academic Press Limited, 105-110.
- Budd, J. e Roberts, R. J. (1978). Neoplasia of Teleosts. In: *Fish Pathology*. Editor: R. J. Roberts. Baillière Tindall, London, U. K., 105-113.
- Budd, J., Schroder, J. D. e Dukes, K. D. (1975). Tumors of the Yellow Perch. In: *The Pathology of Fishes*. Editores: William E. Ribelin e George Migaki. University of Wisconsin Press, 895-906.
- Bylund, G., Valtonen, E. T., Niemelä, E. (1980). Observations on epidermal papillomata in mild and cultured Atlantic salmon *Salmo salar* L. in Finland. *Journal of Fish Diseases*, 3, 525-528.
- Carlisle, J. C. e Roberts, R. J. (1977). An Epidermal Papilloma of the Atlantic Salmon. I: Epizootiology, Pathology and Immunology. *Journal of Wildlife Diseases*, 13, 230-234.
- Freitas, M. S. G. e Albuquerque, M.T.F. (1982). Neoplasia in *Carassius auratus* (Peixe Dourado). *Rep. Trab. I. N. V.*, 45-50.
- Hubbard, G.B. e Fletcher, K. C. (1985). A Seminoma and a Leiomyosarcoma in an Albino African Lungfish (*Protopterus dolloi*). *Journal of Wildlife Diseases*, 21(1), 72-74.
- Johnstone, J. (1924). Malignant Tumors in Fishes. *Journal Marine Biol. Assoc.*, 13, 447-467.
- Mawdesley-Thomas, L. E. (1975). Neoplasia in Fish. In: *The Pathology of Fishes*. Editores: William E. Ribelin e George Migaki. University of Wisconsin Press, 805-870.
- Meyers, T. R. e Hendricks, J. D. (1983). Histopathology of four spontaneous neoplasms in three species of salmonoid fishes. *Journal of Fish Diseases*, 6, 481-499.
- Munday, B. L., Xiao-qun Su e Harshbarger, J. C. (1998). A survey of product defects in Tasmanian Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 169, 297-302.
- Noga, E. J. (1996). In: *Fish Diseases. Diagnosis and Treatment*. Editora: L. L. Duncan. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri, U.S.A., 201-205.
- Obradovic, J., Mâran, B. e Sabocanec, R. (1983). Papillomatosis in the sheat-fish, *Silurus glanis* L. *Journal of Fish Diseases*, 6, 83-84.
- Pallaske, G. (1957). Pathologie Générale. Tumeurs. In: *Histologie Pathologique*. Manuel d'Histopathologie à l'usage des étudiants vétérinaires et des vétérinaires. Vigot Frères, Editeurs, 18-44.
- Peters, G. e Peters, N. (1979). The influence of salinity on growth and structure of epidermal papillomas of the European eel *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases*, 2, 13-26.
- Roberts, R. J. e Bullock, A. M. (1979). Papillomatosis in marine cultured rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 2, 75-77.
- Schlumberger, H. G. e Lucké, B. (1948). Tumors of Fishes, Amphibians and Reptiles. *Cancer Research*, 8, 657-712.
- Sinderman, C. J. 1990. Neoplastic Diseases. In: *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish*. 2ª edição. Academic Press, Inc., 173-199.
- Smith, C. E., (1993). Neoplasia in Salmonids. In: *Fish Medicine*. Editores: W. B. Saunders Company, 428-432.
- Smith, I. R., Ferguson, H. W. e Hayes, M. A. (1989). Histopathology and prevalence of epidermal papillomas epidemic in brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* (Lesueur), and white sucker, *Catostomus commersoni* (Lacépède), populations from Ontario, Canada. *Journal of Fish Diseases*, 12, 373-388.
- Sobel, H. J., Marquet, E., Kallman, K. D. e Corley, G. J. (1975). Melanomas in Platy/Swordtail Hybrids. In: *The Pathology of Fishes*. Editores: William E. Ribelin e George Migaki. University of Wisconsin Press, 945-981.
- Watermann, B., Dethlefsen, V. e Møllergaard, S. (1987). Epidermal Papilloma of Dab. Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. Editores: C. J. Sindermann e C. Maurin. International Council For the Exploration of the Sea, 1-4.
- Yokote, M. (1995). Skin. In: *An Atlas of Fish Histology, Normal and Pathological Features*. Editores: Fumio Takashima e Takashi Hibiya. 2ª edição. Kodansha, Ltd. Tokyo, Japan, 8-17.

Superovulation of Mertolenga cows with two FSH preparations (FSH-P and FOLLTROPIN)

Superovulação de vacas Mertolengas com duas preparações de FSH (FSH-P e FOLLTROPIN)

M.A. Quaresma, L. Lopes da Costa*, J. Robalo Silva

CIISA, Núcleo de Reprodução, Faculdade de Medicina Veterinária, Rua Prof. Cid dos Santos, Polo Universitário, Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa

Summary: Response to superovulation, fertilization rate, production of viable embryos and fertility subsequent to superovulation were evaluated in Mertolenga cows treated with two follicle stimulating hormone (FSH) preparations of high (FSH-P, n=11) or low (FOLLTROPIN, n=10) LH (luteinizing hormone) activity. Fertilisation rate and production of viable embryos were significantly lower ($P<0.001$) in FSH-P than in FOLLTROPIN treated cows. Following transfer of fresh embryos to heifers of the same breed (n=25) a 50 % calving rate was obtained. Fertility of donors at the end of a six-month breeding period that followed superovulation was 95 %. These results show that commercial application of embryo transfer is feasible in Mertolenga cattle.

Resumo: Em vacas dadoras da raça Mertolenga foram comparadas duas gonadotrofinas com alta (FSH-P, n=11) ou baixa (FOLLTROPIN, n=10) actividade LH (luteinizing hormone), sobre a resposta superovulatória, a taxa de fertilização, a produção de embriões viáveis e a fertilidade da época de cobrição após o tratamento superovulatório. A FSH-P induziu uma diminuição significativa ($P<0,001$) da taxa de fertilização e da produção de embriões viáveis, quando comparada com a FOLLTROPIN. A taxa de parição obtida após transferência de embriões a fresco para novilhas receptoras (n=25) da mesma raça (50%) e a fertilidade das dadoras após a época de cobrição subsequente ao tratamento superovulatório (95%) perspectivam a eficiente aplicação prática da tecnologia de transferência de embriões na raça Mertolenga.

Introduction

Embryo transfer (ET) has been considered as a valuable tool for preservation of endangered species and breeds (Wildt *et al.*, 1992; Solti *et al.*, 2000). This technique includes superovulation of donor cows with gonadotrophins for increasing the number of ova released by the female and artificial insemination (AI) of donors at the superovulated oestrus followed by collection of embryos. These are then frozen and stored or transferred to recipients. However, the superovulatory response (SR) varies widely among individuals and treatments, affecting ET efficiency and limiting its practical use (Hahn, 1992). According to this author,

superovulation of donors with identical physiologic characteristics and even superovulation of the same donor at different times can be ineffective in about 15% to 20% of the cases.

The variability of SR has been associated to several factors, including superovulatory (SOV) treatments and specific reproductive physiological characteristics of donors (Bindon *et al.*, 1986; Walton and Stubbings, 1986; Hahn, 1992; Kafi and McGowan, 1997). Gonadotrophin preparations obtained from hypophysial extracts have FSH (follicle stimulating hormone) and LH (luteinizing hormone) biological activity. The FSH:LH ratio affects the SR, and it has been shown that a high LH content negatively affects the SR, fertilisation rate and embryo quality (Donaldson and Ward, 1986; Donaldson *et al.*, 1986; Walton and Stubbings, 1986; Chupin *et al.*, 1987; Herrler *et al.*, 1991; Greve *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1997). However, LH seems to be important for SR (Herrier *et al.*, 1991), although the optimal FSH:LH ratio varies with the breed of the donor (Chupin *et al.*, 1987).

Data obtained from two native breeds of cattle, Mertolenga (Lopes da Costa, 1995; Lopes da Costa *et al.*, 2001) and Alentejano (Lopes da Costa *et al.*, 1993; Lopes da Costa, 1995), showed that fertilisation rate and production of viable embryos were significantly lower after treatment with eCG (equine chorionic gonadotrophin; high LH content) than with FSH preparations with lower LH activity. Because purified hypophysial extracts with low LH content are commercially available, it was decided to determine its effect on fertilisation rate and production of viable embryos in Mertolenga cattle. In heifers, comparison of a purified commercial FSH preparation (FOLLTROPIN) with a preparation of FSH with high LH contamination (FSH-P) showed that the SR and production of viable embryos were greater in donors treated with the gonadotrophin with lower LH content (Mapletoft *et al.*, 1988).

The objective of the present study was to compare

* Corresponding author: e-mail lcosta@fmv.utl.pt

the response of Mertolenga cows to superovulation with two commercial preparations of porcine hypophysial extracts with different LH activity.

Material and methods

Twenty-one Mertolenga parous cows, with at least 50 days *postpartum*, were randomly allocated to the following groups: FOLLTROPIN (n=10) and FSH-P (n=11). The cows, previously maintained at pasture, were separated from the herd and kept in an open paddock from synchronisation of the reference oestrus until embryo collection. Synchronisation of oestrus was performed by the Crestar® method, with the subcutaneous norgestomet implant maintained *in situ* during 10 days. At the time of implant removal, all cows were injected im with 500 IU of eCG (Chronogest) plus 15 mg of a PGF2 α analogue (Prosolvine). The SOV treatment was started during the mid-luteal phase, 10 to 11 days after the reference oestrus. The FSH-P group received a total 36 mg Armour standard units (FSH-P, Schering Corporation, Kenilworth, NJ, USA) and group FOLLTROPIN was treated with 400 mg NIH-FSH-P1 (FOLLTROPIN-V, Vetrephearma, Canada). In both groups the total dose was divided in 8 equal doses, given at 12 hours interval for 4 days. At the time of the sixth and seventh doses all cows were treated with 15 mg of PGF2 α (Prosolvine).

Artificial insemination was performed at 12 and 24 hours after the onset of oestrus with frozen-thawed semen previously collected by electroejaculation from a Mertolenga bull of proven fertility. Two straws (20x10⁶ progressively motile spermatozoa/straw) per insemination were used. Microscopic observation of semen after thawing revealed that progressive motility was about 60%. On day seven (Day 7) after oestrus (Day 0), embryos were collected through uterine flushing by a standard non-surgical procedure (Lopes da Costa *et al.*, 2001). After recovery, the embryos were evaluated and classified for stage of development and quality according to criteria of the IETS (International Embryo Transfer Society, 1998). Embryos on stages 4 to 7 (compact morula to expanded blastocyst) and of quality 1-2 (excellent-good) were considered as viable. Fertilisation rate was calculated by the formula: fertilisation = total n° of fertilised ova / (total n° of oocytes + embryos recovered) x 100. Response to superovulation was considered to be positive when 3 or more *corpora lutea* (CL) were identified by rectal palpation at the time of embryo recovery. After embryo recovery all donors were injected im with 22.5 mg of PGF2 α (Prosolvine) and, after joining to a Charolais bull, the traditional 6 month breeding period followed. Dates of calving and the phenotype of calves were recorded at parturition. These data were used for evaluation of fertility at the end of the breeding season (number of cows that calved / number of cows joined to the bull x 100) and for identification of paternity

(Mertolenga from AI, *versus* Charolais Crosses from mating).

In vivo evaluation of embryo viability was done by nonsurgical transfer of one fresh embryo to the ipsilateral uterine horn of the CL-bearing ovary of two-year old recipient virgin heifers (n=25) of the Mertolenga breed (18 heifers received embryos from group FOLLTROPIN and 7 heifers received embryos from group FSH-P). Synchronisation of the recipient oestrus was done, like that of donors, by the Crestar® method combined to eCG (400 UI) and to PGF2 α (7.5 mg). Embryos were transferred by a nonsurgical standard method (Lopes da Costa *et al.*, 2001), on Day 7 of the oestrus cycle (Day 0 = day of oestrus). Pregnancy of recipients was presumed when plasma P4 < 1.0 ng mL⁻¹ on Day 0, \geq 1.0 ng mL⁻¹ on Day 7 and \geq 2.0 ng mL⁻¹ on Day 21. Pregnancy was confirmed by ultrasound scanning at 45 days of gestation and calving data were subsequently recorded. The same operator performed recovery and transfer of all embryos.

Plasma progesterone (P4) was measured using a commercial solid phase radioimmunoassay (RIA) system (Coat-A-Count, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA), and samples were run in duplicate. Blood samples were collected from a tail vessel into heparinised tubes at the following times: donors – day of reference oestrus, days of gonadotrophin injections, Day 0 and Day 7; recipients – Days 0, 7 and 21. Immediately after collection, blood samples were centrifuged and plasma was separated and stored at -20 °C till P4 analysis. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 8.9% and 9.6%, respectively.

Data were analysed using a statistical package (STATISTICA 5.0, StatSoft Inc., 1995, Tulsa, OK, USA) by Chi-square tests in contingency tables (Fisher exact test), and the non-parametric Mann-Whitney U test where appropriate. Significance was tested at the 5% level (P < 0.05). A P value of 0.1 > P > 0.05 was considered a tendency to significance.

Results

As shown in Table 1, the number of donors with SR and the mean number of embryos recovered were similar in both groups. However, donors from group FOLLTROPIN yielded a significantly higher mean number of viable embryos and a significantly lower mean number of unfertilised oocytes than donors from group FSH-P did. These results are presented in Table 2 as percentages. This table also shows that fertilisation rate was significantly higher in the group FOLLTROPIN than in the group FSH-P. In donors with SR, the mean plasma P4 level on Day 7 was significantly higher in those treated with FOLLTROPIN than in those treated with FSH-P (mean \pm standard error of the mean: 29.8 \pm 5.4 ng mL⁻¹ *versus* 15.3 \pm 3.7 ng mL⁻¹; P < 0.05).

Figure 1 illustrates the stage of embryo development.

Although there were no significant differences on embryo stage between groups, the number of embryos in the blastocyst stage tended to be significantly greater ($P < 0.06$) in group FOLLTROPIN than in group FSH-P. Three recipients that received embryos from group FOLLTROPIN had P4 concentrations on Day 7 lower than 1.0 ng mL^{-1} (0.6; 0.1; 0.1), although a CL was identified by rectal palpation in all of them. None of the embryos transferred to these heifers survived. Excluding these recipients, pregnancy rate was 73.3% (11/15) and 85.7% (6/7) in groups FOLLTROPIN and FSH-P, respectively. However, calving rate was only 50% (11/22; 5 from group FOLLTROPIN and 6 from group FSH-P). At the end of the traditional six-month breeding period calving rate of donors was 95% (all but one donor from group FSH-P calved). The calves born were all Charolais crosses, except two (one from each group) that were pure Mertolenga, as shown by their phenotype.

Discussion

It is presumed that the two gonadotrophins used in this study varied widely in LH activity, although the exact LH content of the gonadotrophins was not determined. In fact, it is known that FSH-P is a relatively crude porcine pituitary extract with high LH content, although it varies from batch to batch (Donaldson, 1986; Lindsell *et al.*, 1986). FOLLTROPIN is a purified preparation of lower LH activity because of removal of about 80 % of its original LH content (Wu *et al.*, 1988). It is claimed that LH content of gonadotrophins affect response to superovulation, and that fertilisation rate and embryo quality are favoured by treatments with gonadotrophins of low LH activity (Donaldson and Ward, 1986; Donaldson *et al.*, 1986; Herrler *et al.*, 1991), although the correct FSH:LH ratio is breed dependent (Chupin *et al.*, 1987).

The results obtained in this study show that the mean total number of embryos recovered was similar to that obtained in other breeds of cattle also submitted to superovulation with identical FSH preparations (Donaldson and Ward, 1986; Mapletoft *et al.*, 1988; Kelly *et al.*, 1997; Chagas e Silva *et al.*, 2002a).

Table 1 - Effect of gonadotrophins on superovulatory response (SR) in Mertolenga cattle.

Parameter	Gonadotrophin		P Value
	FOLLTROPIN	FSH-P	
Donors - n	10	11	-
positive SR	9 (90.0%)	8 (72.7%)	1.00
Total ova recovered	10.0 ± 2.2	8.5 ± 2.4	0.64
Viable embryos	6.4 ± 1.2	1.6 ± 0.7	0.005
Degenerated embryos	2.8 ± 0.9	1.1 ± 0.4	0.10
Non-fertilised oocytes	0.8 ± 0.3	5.8 ± 0.9	0.05

Values for recovery of embryos are means \pm standard error of the mean, per cow with positive SR

Results suggest that LH activity of the gonadotrophin had a significant influence on fertilisation rate and on embryo quality. Results obtained previously, also in Mertolenga, (Lopes da Costa *et al.*, 2001) showed that eCG, a preparation with high LH activity, had a negative effect upon embryo quality when compared to FSH-P. The negative effects of non-purified gonadotrophin preparations upon fertilisation and embryo quality may be due to problems with transport of the gametes to the fertilisation site or to oocyte maturation problems (Greve *et al.*, 1995).

In donors with SR, mean plasma P4 concentrations on Day 7 were significantly higher in group FOLLTROPIN than in group FSH-P, which might be explained by the higher mean number of ova recovered observed in the former group when compared to the latter group. The fact that the stage of development of embryos produced from FOLLTROPIN-treated cows was more advanced than that of embryos produced by donors treated with FSH-P may be related to differences in P4 concentrations on Day 7. In fact, it has been reported that, in the cow, development of the embryo is accelerated when there is a faster increase of post-ovulatory P4 concentration (Mann and Lamming, 2001).

The occurrence of abnormal luteal function following oestrus synchronisation of Mertolenga recipient heifers has been reported earlier (Lopes da Costa *et al.*, 1992). These authors have reported that below a minimum P4 level (1.0 ng mL^{-1} on Day 7), embryo survival is significantly reduced or null, an observation that was confirmed in a more recent study (Chagas e Silva *et al.*, 2002b). Foetal losses observed in this study were attributed to severe management changes dependent on adverse climatic and nutritional conditions, which negatively affected fertility of the whole group of heifers in the herd. However, the reason why only pregnancies originated from embryos from group FOLLTROPIN were interrupted could not be explained.

The donors conception rate subsequent to superovulation was similar to that reported in studies that used equivalent treatments (90 %) (Lopes da Costa *et al.*, 2001) and to that of non-treated cows of the same breed submitted to the same traditional mating system (92 %) (Bettencourt *et al.*, 1987). The fact that 2 pregnancies were not interrupted after injection of the cows with a luteolytic agent, on day of embryo recovery, may suggest a luteotrophic/antiluteolytic effect of the

Table 2 - Effect of gonadotrophins on fertilisation rate and on embryo production in Mertolenga cows.

Parameter	Group		P value
	FOLLTROPIN	FSH-P	
Total ova recovered - n	90	68	0.77
Viable embryos - n (%)	58 (64.4%)	13 (19.1%)	0.0003
Degenerated embryos - n (%)	25 (27.8%)	9 (13.2%)	0.07
Non-fertilised oocytes - n (%)	7 (7.7%)	46 (67.6%)	0.0001
Fertilisation rate - n (%)	83 (92.2%)	22 (32.3%)	0.0002

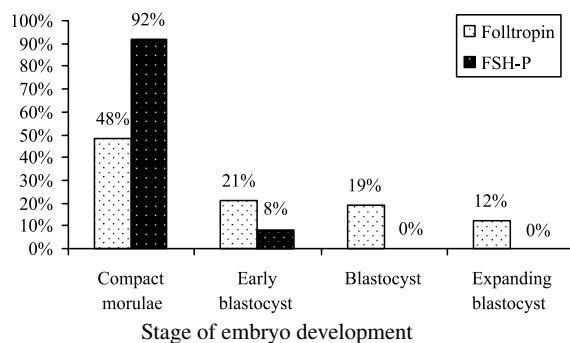


Figure 1 - Effect of gonadotrophins on stage of embryo development.

gonadotrophin and/or of the retained embryo.

In conclusion, gonadotrophins with high LH content seem to have negative effects on fertilisation rate and production of viable embryos in Mertolenga cattle. The reasonable calving rate obtained after transfer of fresh embryos to heifers, and the fact that fertility of donors subsequent to superovulation was similar to that observed in non-treated cows kept under the same management system, suggests that ET has potential practical application in this breed.

References

- Bindon, B.M., Piper, L.R., Cahill, L.P., Driancourt, M.A., O'Shea, T. (1986). Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology*, 25, 53-70.
- Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L., Robalo Silva, J. (2002a). Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. *Animal Reproduction Science*, 69, 1-8.
- Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L., Robalo Silva, J. (2002b). Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*, 58, 51-59.
- Chupin, D., Cognié, Y., Combarous, Y., Procureur, R.; Saumande, J. (1987). Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and ewe. In Roche, J.F. and O'Callaghan, D. (editors), *Follicular growth and ovulation rate in farm animals*. Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, pp. 66-72.
- Donaldson, L.E. (1986). FSH-P batch variation. *Theriogenology*, 33, 215 (Abstract).
- Donaldson, L.E., Ward, D.N. (1986). Effects of luteinizing hormone on embryo production in superovulated cows. *Veterinary Record*, 119, 625-626.
- Donaldson, L.E., Ward, D.N., Glenn, S.D. (1986). Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 25, 747-757.
- Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R., Assey, R. (1995). Effects of exogenous gonadotrophins in oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, 43, 41-50.
- Hahn, J. (1992). Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*, 38, 269-275.
- Herler, A., Elsaesser, F., Parvizi, N., Niemann, H., (1991). Superovulation of dairy cows with purified FSH supplemented with defined amounts of LH. *Theriogenology*, 35, 633-643.
- IETS, 1998. Manual of the International Embryo Transfer Society, Stringfellow, D.A. e Seidel, S.M. (editors), Third edition, International Embryo Transfer Society, Inc., Savoy, Illinois, USA.
- Kafi, M., McGowan, M. (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response in cattle. *Animal Reproduction Science*, 48, 137-157.
- Kelly, P., Duffy, P., Roche, J.F., Boland, M.P. (1997). Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal Reproduction Science*, 46, 1-14.
- Lindsell, C.E.; Rajkumar, K.; Manning, A.W.; Emery, S.K.; Mapletoft, R.J.; Murphy, B.D. (1986). Variability in FSH:LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. *Theriogenology*, 25, 167 (Abstract).
- Lopes da Costa, L. (1995). Studies on the use of Alentejana and Mertolenga native cattle breeds as embryo donors and recipients. PhD Thesis, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Lopes da Costa, L.F., Freitas Duarte, A.J., Nunes Duarte, J.C., Cidadão, M.R., Chagas e Silva, J.N. (1992). Estrus induction and synchronization in Mertolenga heifers and fertility after transfer of frozen-thawed Holstein embryos. VI Jornadas Internacionais de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Salamanca, Spain, Libro de Comunicaciones, pp. 209-215.
- Lopes da Costa, L.F., Marques, C.M., Vasques, M.I., Horta, A.E.M. (1993). Superovulation and embryo production in portuguese Alentejano beef cattle. 5th International Symposium on Animal Reproduction, Luso, Portugal, Vol.II, pp. 126-131.
- Lopes da Costa, L., Chagas e Silva, J., Robalo Silva, J. (2001). Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology*, 56, 65-77.
- Mann, G.E., Lamming, G.E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, 121, 175-180.
- Mapletoft, R.J., Gonzalez, A., Lussier, J.G. (1988). Superovulation of beef heifers with Folltropin or FSH-P. *Theriogenology*, 29, 274 (Abstract).
- Solti, L., Crichton, E.G., Loskutoff, N.M., Cseh, S. (2000). Economical and ecological importance of indigenous livestock and application of assisted reproduction to their preservation. *Theriogenology*, 53, 149-162.
- Walton, J.S., Stubbings, R.B. (1986). Factors affecting the yield of viable embryos by superovulated Holstein-Friesian cows. *Theriogenology*, 26, 167-177.
- Wildt, D.E., Monfort, S.T., Donoghue, A.M., Johnston, L.A., Howard, J. (1992). Embryogenesis in conservative biology – or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology*, 37, 161-184.
- Wu, M., Wang, H., Murphy, B.D., Mapletoft, R.J. (1988). Superovulation with FOLLTROPIN: a dose trial. *Theriogenology*, 29, 332 (Abstract).

Bacillaceae spores, fungi and aflatoxins determination in honey

Esporos de *Bacillaceae*, fungos e aflatoxinas em mel

Hermínia Marina Martins^{1*}, M. Lígia Martins¹, Fernando M. A. Bernardo²

¹Laboratório Nacional de Investigação Veterinária - Serviço de Micologia, Estrada de Benfica, nº 701, 1549 - 011 Lisboa - Portugal

²CIISA - Faculdade de Medicina Veterinária, Polo Universitário da Ajuda, Rua Professor Cid dos Santos, 1300- 477 Lisboa - Portugal.

Summary: Consumption of honey has remarkably increased in the last years all over the world. However, the safety of these products is not regularly assessed. This paper presents the results of a study hold in 80 samples of honey, randomly collected in retail markets, concerning to the contamination with *Bacillaceae* spores (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*), fungi and aflatoxins. The microflora was determined using conventional microbiological methods and the aflatoxins were detected by "high performance liquid chromatography" (HPLC). Spores of *Clostridium perfringens* were not detected in any sample. *Bacillus cereus* were identified in eleven samples (13.7 %); of these, five (6.2%) had levels lower than 10², five (6.2%) samples contained levels ranging from 10³ to 10⁴ cfu/g and only one (1.3%) presented contamination above 10⁵ cfu/g. Yeasts and moulds were detected in 71 samples (88.8%). Three genera of moulds (*Aspergillus*, *Penicillium* and *Mucor*) and two genera of yeasts (*Saccharomyces* and *Candida*) were identified. The most prevalent among *Aspergillus* was *A. flavus* (57.5%), followed by *A. niger* (51.3%), *A. fumigatus* (45.0%) and *A. candidus* (28.7%). *Penicillium* spp. and *Mucor* sp. were present in 38.8 and 31.3 % respectively. *Saccharomyces* sp. and *Candida humicola* had high incidence (88.8 and 75.0 % respectively). None of samples revealed to be contaminated with aflatoxins.

Key words: Bacteria, fungi, aflatoxins, honey

Resumo: Nos últimos anos, o consumo do mel tem aumentado significativamente. Contudo, a respectiva avaliação higio-sanitária não está suficientemente estudada. Neste trabalho os autores apresentam os resultados de pesquisas, em 80 amostras de mel, colhidas aleatoriamente a partir do comércio não especializado, de *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e das contaminações fúngicas obtidos por métodos microbiológicos convencionais, e de aflatoxinas detectadas por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). *C. perfringens* não foi isolado em qualquer das amostras analisadas. *Bacillus cereus* foi identificado em 11 amostras (13,7 %); destas, cinco apresentaram contaminações inferiores a 10² ufc/g (6,2%), outras cinco amostras continham níveis compreendidos entre 10³ e 10⁴ ufc/g (6,2%) e apenas uma apresentava teores da ordem de 10⁵ ufc/g (1,3%). Bolores e leveduras foram isoladas em 71 amostras (88,8 %). Foram identificados três géneros de bolores (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor*) e dois de leveduras (*Saccharomyces* e *Candida*). Entre os isolados de *Aspergillus*, o de maior prevalência foi *A. flavus* (57,5%), seguido de *A. niger* (51,3%), *A. fumigatus* (45,0%) e *A. candidus* (28,7%). *Penicillium* spp. e *Mucor* sp. foram isolados

respectivamente em 38,8 e 31,3 %. *Saccharomyces* sp. e *Candida humicola* foram detectados com elevada frequência (88,8 e 75,0 %). Não se detectaram aflatoxinas em qualquer amostra .

Palavra chave: Bacteria, fungos, aflatoxinas, mel

Introduction

Honey is an interesting food that can be used as an ingredient or as a final product. New technologies and innovative uses of honey are an expanding market (Snowdon and Cliver, 1996). Honey may undergo various changes during storage, one of the most significant of which is spontaneous fermentation induced by osmophilic yeast (Jiménez *et al.*, 1994). Honey is mainly composed by sugars, particularly the mono-saccharides fructose and glucose, though it contains a large variety of di- and trisaccharides (White, 1983). Honey is packaged for retail sale, and is presented in bulk for commercial distribution. Microbiological characteristics of honey are inherent to quality and safety. The microbes of concern in honey are primarily yeasts, moulds and spore-forming bacteria. These microorganisms may be involved in activities such as spoilage of provisions, production of enzymes, antibiotics, mycotoxins and growth factors (vitamins, amino acids), metabolic conversion of provisions, and inhibition of competing microorganisms (Goerzen, 1991). Honey has been incriminated as a source of *C. botulinum* spores responsible for infant botulism cases (Amon *et al.*, 1981). A different clinical form of botulism, has been recently recognised in infants under 1 year of age. In this type of botulism spores of bacteria apparently germinate and produce toxin in the intestinal tract of affected infants (Huttanen *et al.*, 1981).

Pollen may be the original source of microbes for honey (Gilliam *et al.*, 1983). The honey bees appear to be seeded microbiologically by pollen consumption and by other bees in the colony through food exchange (Snowdon and Cliver, 1996). In Portugal, in a preliminary study on honey, Martins *et al.*, (2001) showed

* Corresponding author: e-mail marina.martins@lniv.min-agricultura.pt

that there was a low percentage of contamination with *Bacillus cereus*, and with fungi: yeasts, *Mucor* sp, *Penicillium* spp and several species of genus *Aspergillus*, particularly *Asp. flavus*, *Asp. candidus*, *Asp. fumigatus* and *Asp. niger*. These potentially pathogenic species can be harmful to predisposed patients. The infestation of natural food by these toxigenic fungi, and the resultant toxin contamination (mycotoxins) have been deemed as unavoidable contamination by the US Food and Drug Administration (FDA). Among mycotoxins, aflatoxins could pose a significant threat to human health because they are toxigenic, carcinogenic, mutagenic and teratogenic (Hsieh, 1986), besides the economic loss due to food contamination. A great deal has been written about the acute toxicity and carcinogenicity of the aflatoxins as well as the pathways leading to their biosynthesis by some strains of *Asp. flavus*, *Asp. nomius* and *Asp. parasiticus* (Betina, 1989). Other safety problems related with pesticide residues are constantly monitored (Garcia *et al.*, 1995; Fernandez *et al.* 1997).

The objective of the present study is to give a preliminary assessment of microbial and aflatoxin contamination of multifloral honey from Portugal.

Material and methods

Sampling procedure

Eighty multifloral honey samples were randomly collected at the retail public markets, in the city of Lisbon, Portugal. All packaged samples (200 g) were transported and stored at room temperatures (20 °C).

Pre-treatment of samples

Ten grams of each sample were homogenized for 3 min in 90 ml (10^{-1} suspension) peptone water (Oxoid, code CM 9, Basingstoke, England) in a Colworth 400 Stomacher (Seward Medical, London, UK). Ten-fold dilutions were prepared till 10^{-4} .

Detection of *Bacillus cereus* spores

For *Bacillus cereus* spores enumeration, 1 ml of the each dilution was spread on five Petri plates of Mannitol-bromothymol blue agar supplement with polymyxin (Oxoid code number SR 99 Basingstoke, England) and egg yolk Emulsion (Oxoid code number SR 47 Basingstoke, England) (0.25 ml/plate), after thermal inactivation of each inoculum at 80 °C for 10 min in a water bath. The plates were incubated in inverted position at 37 °C for 48 h. After enumeration of morphologically typical colonies, peacock blue colonies with blue halos, were picked for biochemical identification according to ICMSF (1996), ISO 7932, (1987) and Bergey's Manual of systematic bacteriology (Sneath *et al.*, 1986).

Detection of *C. perfringens* spores

For the enumeration of *Clostridium perfringens*, 1 ml of each decimal dilution was incorporated onto Tryptose sulfite cycloserine Agar (TSC) (Oxoid code number CM 0587D; SR88 Basingstoke, England) after thermal treatment at 80 °C for 10 minutes (ISO, 1995). The plates were incubated in inverted position, under anaerobic conditions, for 48 h at 45 °C.

Mycological examination

For enumeration and identification at genus level of moulds and yeast, 1 ml of honey of each dilution was spread into each of five plates (0.2 ml/plate) of Glucose Yeast Extract Sucrose Agar (GYES) (King *et al.*, 1984) and incubated at 28 °C for 3-5 days. Each isolated mould colony was observed microscopically for morphological characterization and identification (Domsch *et al.*, 1980; Samson and Pitt, 1989).

Selected yeast strains from each group were identified using API ID 32 C galleries system (Bio Merieux - 32200, France). Complementary biochemical tests were performed for *Saccharomyces* and *Candida* species (Barnett *et al.*, 2000).

Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 by HPLC

The samples were analysed for the quantification of AFs using immunoaffinity columns supplied from Rhône - diagnostics Technologies Ltd (Spain), and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the method described by Stroka *et al.* (2000), with modifications in the initial extraction phase. The solvent mixture was water + methanol (8+2) instead of methanol+water (8+2,v/v). The detection limit was 1 µg/kg. The sample extract was filtered, diluted and applied in an immunoaffinity column containing antibodies specific to aflatoxins B1, B2, G1 and G2. Standard AFs B1, B2, G1 and G2 were purchased from Sigma-Aldrich (Ref. A-6636, A-9887, A-0138 and A-0263 respectively) (Quimica S.A. Spain). The stock solution, working standards and the calibration curve were prepared and determined as described by Stroka *et al.*, (2000). The recoveries were done in duplicate, in blank samples of honey (1kg), spiked with levels of 4.0 mg/kg of AFB1 and AFG1, and 2.0 mg/kg of AFB2 and AFG2. The average recoveries were 89.5 % for AFB1, 87.0% for AFB2, 88.3 % for AFG1 and 86.2 % for AFG2. Samples with AFs levels below 1 mg/kg were considered negative (inferior to the quantification limit).

Results

From the 80 samples, only nine do not revealed any microbial contamination (11.3%) in one gram. Eleven

of the samples (13.8%) were contaminated with spores of *B. cereus*, five (6.2%) of which had levels lower than 10^2 , five samples (6.2%) with levels greater than 10^3 cfu/g; one sample (1.3%) revealed to be contaminated with 10^5 spores/g. Spores of *C. perfringens* were not detected in any sample (1 g) (Table 1).

Of the 80 samples analysed, 71(88.8%) were contaminated with fungi; of these samples, 46 were contaminated with moulds and yeasts, and 25 samples presented only yeasts. The moulds identified were: *Asp. candidus* (28.7%), *Asp. flavus* (57.5%), *Asp. fumigatus* (45.0%), *Asp. niger* (51.3%), *Mucor* sp. (31.3%) and *Penicillium* spp. (38.8%), with levels ranging from 10^1 to 10^2 cfu/g (Table 1).

Two yeast species were identified: *Candida humicola* (75.0%) and *Saccharomyces* sp. (88.8%); Its level of contamination ranged between 10^4 and 10^5 cfu/g.

None of samples revealed to be contaminated with aflatoxins.

Discussion

Huttanem *et al.* (1981), in 80 honey samples collected from apiaries in Pennsylvania, Illinois and New Jersey, did not found *Clostridia* spores. In another study, Kautter *et al.* (1982), in 100 samples of honey found only two samples (2.0 %) contaminated with *Clostridium botulinum* spores. The present study does not revealed contamination superior to 1 spore/g (limit of quantification).

Hauschild *et al.* (1988), state that honey generally contains few botulinic spores. According to Bonvehi and Jordá (1993) the presence of *Bacillus* spores are at low incidence in multifloral honey. The results of the present study revealed contamination by *B. cereus* in 11 samples; one of the samples had a heavy contamination ($> 10^4$ spores/g). Potential toxigenic effects are achieved on levels above 10^5 spores/g.

Jiménez *et al.*, (1994), studying raw honey referred that the dominant mycoflora included *Aspergillus flavus*, *Asp. niger*, *Asp. candidus*, *Asp. terreus*, *Penicillium* spp., *Saccharomyces* sp. and *Zygosaccharomyces*. This study partially confirms this findings.

The yeast species identified (*Candida humicola* and *Saccharomyces* sp.) were detected in a very high frequency and at high levels of contamination. This osmophylic yeast are probably good indicators for microbiological quality of honey.

There are few informations concerning mycological contamination and simultaneous co-occurrence of *Asp. flavus* or *Asp. parasiticus* and aflatoxins detection in honey. Hilldrup *et al.* (1977), studied fungal growth and aflatoxin production on apiarian substrates (unprocessed honey, pollen, brood comb, whole larvae and whole bees), and verified that fungi grew, sporulated and produced aflatoxins in low levels in all substrates except the unprocessed honey. Other similar study, carried out by Wellford *et al.* (1978), inoculated unprocessed honey with toxigenic strains of *Asp. flavus* NRRL 5862 and *Asp. parasiticus* NRRL 2999, the fungal growth was observed, but none of the cultures produced detectable levels of aflatoxins. The results presented by these researchers agree with those obtained in the present study and allow us to conclude that microbial contamination levels in honey is generally low. It is not surprising to find that none of the stains of *Asp. flavus* have produced aflatoxins, because the production depends not only of the genetic competence of the strains, but is also influenced by a quite wide range of factors (substrate composition, very low *aW*, and acidity of honey) and ecological conditions.

References

- Amon, S. S., Damus, K. and Chin, J. (1981). Infant botulism: epidemiology and relation to sudden infant death syndrome.

Table 1 - Frequency of microflora identified in honey (Total samples - 80)

Microorganisms	Number of positives samples / levels of contamination (%)				
	< 1 ufc/g	10^1 - 10^2 (%)	10^2 - 10^3 (%)	10^3 - 10^4 (%)	10^4 - 10^5 (%)
Bacteria					
<i>Bacillus cereus</i>	69 (86.3)	5 (6.2)	0	5 (6.2)	1 (1.3)
<i>Clostridium perfringens</i>	80 (100.0)	0	0	0	0
Fungi					
<i>Aspergillus candidus</i>	57 (71.3)	23 (28.7)	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	34 (42.5)	46 (57.5)	0	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	44 (55.0)	36 (45.0)	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	39 (48.8)	41 (51.3)	0	0	0
<i>Mucor</i> sp	55 (68.8)	25 (31.3)	0	0	0
<i>Penicillium</i> spp	49 (61.3)	31 (38.8)	0	0	0
<i>Candida humicola</i>	20 (25.0)	0	0	60 (75.0)	0
<i>Saccharomyces</i> sp	9 (11.3)	0	0	71 (88.8)	0

- Epidemiol. Rev.* 3, 45-66.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. (2000). *Yeasts: Characteristics and identification* Third edition. Cambridge University Press. UK.
- Betina, V. (1989). *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects*, edited by Elsevier New York, USA. 114-150.
- Bonvehí, J. S. and Jordá, D. R. E. (1993). The Microbiological Quality of Honey as Determined by Aerobic Colony Counts. *J. Food Prot.* 56, 4, 336-337.
- Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. (1980). *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, New York, USA. pp 1156.
- Fernandez, M. M. A., Sancho, M. T., Simal-Gandarra, J., Creus-Vidal, J. M., Huidobro, J. F. and Simal-Lozano, J. (1997). Acaricide residues in honeys from Galicia (N. W. Spain). *J. Food Prot.* 60 (1), 78-80.
- García, M. A., Fernández, M. I. and Melgar, M. J. (1995) Contamination of honey with organophosphorus pesticides. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 54 (6), 825-832.
- Gilliam, M., Moffett, J. O. and Kauffeld, N. M. (1983). Examination of floral nectar of citrus, cotton and Arizona desert plants for microbes. *Apidologie*, 14, 299-302.
- Goerzen, D. W. (1991). Microflora associated with the alfalfa leafcutting bee, *egachile rotundata* (Fab) (Hymenoptera: Megachilidae) in Saskatchewan, Canada. *Apidologie*, 22, 553-561.
- Hauschild, A. H. W., Hilsheimer, R., Weiss, K. F. and Burke, D. R. B. 1988. Clostridium botulinum in Honey, Syrups and Dry Infant Cereals. *J. Food Prot.* 51, 11, 892-984.
- Hilldrup, J. A. L., Eadie, T. and Llewellyn, G. C. (1977). Fungal growth and aflatoxin production on apiarian substrates. *J.A.O.A.C.* 60, 96-99
- Hsieh, D. P. H. (1986). The role of aflatoxins in human cancer, p.447-456 In *Mycotoxins and Phycotoxins*. Edited by P. S. Steyn and R. Vleggaar, Elsevier Science Publishers, Amsterdam; The Netherlands.
- Huttanen, C. N., Knox, D. and Shimanuki, H. (1981). Incidence and Origin of Clostridium botulinum spores in Honey. *J. Food Prot.* 44, 11, 812-814.
- ICMFS (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1996). *Microorganisms in foods 5—microbiological specifications of food pathogens*. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- ISO (International Standards Organization). (1987). *Microbiology—General Guidance for the enumeration of Bacillus cereus colony count technique*. ISO 7932. International Standards Organization, Geneva, Switzerland.
- ISO (International Standards Organization). (1995). *Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for enumeration of Clostridium perfringens. Colony-count technique*. ISO 7937. International Standards Organization, Geneva, Switzerland.
- Jiménez, M., Mateo, J. J., Huerta, T. and Mateo, R. (1994). Influence of the storage conditions on some Physicochemical and Mycological Parameters of Honey. *J. Sci. Food Agric.* 64, 67-74.
- Kautter, D. A., Timothy, L. Jr., Solomon, H. M. and Lynt, R. K. (1982). Clostridium botulinum Spores infant foods: A Survey. *J. Food Prot.* 45, 11, 1028-1029.
- King, A. D. Jr., Pitt, J. I., Beuachat, L. R. and Coory, J. E. L. (1984). *Methods for the Mycological Examination of Food*. Ed. King, A. D. Jr., J. I. Pitt, L. R. Beuachat and J. E. L. Coory. London, UK
- Martins, H. M., Martins, L., Lança, A. and Bernardo, F. (2001). Microbial safety assessment of honey bees (*Apis mellifera*) p 146, In *Proceeding Book, Micro 2001, Congresso Nacional de Microbiologia, Póvoa de Varzim, Portugal*.
- Samson, R. A. and Pitt, J. I. (1989). *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*. Ed by Robert A. Samson and John I. Pitt. NATO ASI Series. Series A: Vol. 185. Plenum Press, New York. USA.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharp, M. E. and Holt, J. G. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2, edited by Willams & Wilkins. Baltimore, USA.
- Snowdon, J. A. and Cliver, D. O. (1996). Microorganisms in honey. Review article. *Int. J. Food Microb.* 31, 1-26.
- Stroka, J., Anklam, E., Jorissen, U. and Gilbert, J. (2000) Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. *J.A.O.A.C. Int.* 83, 320-340.
- Wellford, T. E., Eadie, T. and Llewellyn, G. C. (1978). Evaluation the inhibitory action of honey on fungal growth sporulation, in aflatoxin production. *Z. Lebensm Unters Forsch.* 28, 166, 280-283.
- White, J. W. Jr. (1983). Honey. *Adv. Food Res.* 24, 287-374.

Comparação entre o método da dupla zaragatoa e o da excisão na determinação de contagens de microrganismos totais viáveis e de *Enterobacteriaceae* na superfície interna e externa de carcaças de suíno

A comparison between double swab and excision sampling methods for evaluation of total viable microorganisms and *Enterobacteriaceae* counts on internal and external surfaces of the pork carcass

Madalena Vieira-Pinto^{1*}, Maria Manuel Silva²; Alexandra Esteves¹ e Conceição Martins¹

¹ Secção dos Produtos Animais, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 1013, 5001-911 Vila Real

² Indústria Alimentar Aleu, Bairro dos Prazeres, 5000-592 Vila Real

Resumo: Neste estudo efectuou-se a determinação de Contagens de Microrganismos Totais Viáveis (CTV) e de *Enterobacteriaceae* na superfície interna e externa de 38 carcaças de suíno, utilizando os métodos de amostragem definidos na Decisão Europeia 2001/471/CE: o da dupla zaragatoa e o da excisão, pretendendo-se: comparar a eficiência das duas técnicas de amostragem na determinação de CTV e de *Enterobacteriaceae*, e analisar o tipo de correlação que se pode estabelecer entre ambas, assim como avaliar a superfície interna da carcaça como local alternativo para a aplicação do método de excisão, uma vez que o dano provocado na apresentação comercial da carcaça não é tão visível. Observou-se, neste estudo, que o método de excisão revelou valores de CTV e de *Enterobacteriaceae* superiores comparativamente ao método da zaragatoa dupla, sendo esta diferença altamente significativa ($P < 0,001$). Também se constatou a existência de uma boa correlação entre os valores obtidos pelo método da zaragatoa e pelo da excisão, o que nos indica que a análise de regressão pode ser utilizada como base para o estabelecimento de equações de regressão que permitam estimar os valores esperados através do método de excisão a partir dos valores obtidos pelo método da zaragatoa (menos traumático e mais simples). Dos modelos de regressão ajustados, linear, quadrático e exponencial, este último foi o que permitiu obter resultados mais significativos. Não se verificou uma diferença significativa entre os valores de CTV obtidos para a superfície interna e a externa da carcaça, quando determinados pelo método de excisão. Contrariamente, os valores de *Enterobacteriaceae* foram significativamente maiores ($P < 0,05$) na superfície interna, o que pode significar uma maior contaminação fecal desta superfície. Por estes factos, julgamos que a superfície interna pode ser considerada como um local de amostragem alternativo para a aplicação do método de excisão.

Summary: The objectives of this study were the comparison between two surface sampling techniques efficacy, skin excision (destructive technique) and double moist swab (non destructive technique) methods, which are defined in the European Decision 2001/471/CE, in estimating Total Viable Microorganisms and *Enterobacteriaceae* Counts, and the evaluation of the use of carcass internal surface, as an alternative sampling site for the determination of the carcass contamination level. The results,

from a sample of 38 pork carcasses, enable to state that the excision method revealed values of TVC and *Enterobacteriaceae* superiors comparatively to those achieved by the method of the double swab, being this difference highly significant ($P < 0,001$). Results from correlation analysis, between values obtained by means of the swab method and those from the excision method, were significant ($P < 0,05$) for the external surface and highly significant ($P < 0,001$) for the internal surface, which means that regression analysis could be used in order to calculate a regression equation which enable to predict TVC and *Enterobacteriaceae* values of the excision method through values calculated by the use of the swab method (less traumatic and simpler). Three models were used, linear, quadratic and exponential, being the best results achieved using the last one. No significant differences were found between values of TVC for the internal and external carcass surface when assessed by the excision method. Contrarily, the values of *Enterobacteriaceae* were significantly higher ($P < 0,05$) for the internal surface then for external surface, which means a larger faecal contamination of this surface. For these facts we believe that the internal surface can constitute an alternative sampling site for the application of the excision method in bacteriological evaluation of pork carcasses.

Key words: Carcass contamination; bacteriological monitoring

Introdução

A contaminação inicial de carne pode ocorrer durante o abate dos animais no matadouro (Fliss *et al.*, 1991; Troeger, 1994; Untermann *et al.*, 1996; Veloso, 2000). A avaliação da contaminação bacteriológica da superfície de carcaças em matadouro é necessária para determinar a preservação da sua qualidade higiénica (Niskanen e Pohja, 1977; Cordray e Huffman, 1985; Fliss *et al.*, 1991). Têm sido sugeridas várias técnicas de amostragem para avaliar o nível de contaminação bacteriológica da superfície das carcaças. As mais usadas são a da zaragatoa, a da placa por contacto e a da excisão (Snijders *et al.*, 1984).

* Correspondência: mmvpinto@utad.pt

A Decisão Europeia 2001/471/CE é, actualmente (desde Junho de 2001), a referência legal para a avaliação bacteriológica da superfície externa de carcaças nos matadouros europeus. Esta Decisão descreve tanto o método de amostragem como os procedimentos de determinações bacteriológicas e define o nível aceitável e inaceitável de contaminação (Contagens Totais Viáveis e *Enterobacteriaceae*) da superfície externa das carcaças. No entanto, estes valores de referência (Tabela 1) são apenas aplicáveis para amostras recolhidas pelo método de excisão.

Os objectivos deste trabalho foram comparar a eficiência da técnica de excisão (técnica destrutiva) e da técnica da zaragatoa dupla na determinação de CTV e de *Enterobacteriaceae*, de acordo com a Decisão Europeia 2001/471/CE, e avaliar se a superfície interna da carcaça pode constituir um local alternativo para a aplicação do método de excisão, uma vez que o dano provocado por esta técnica na apresentação comercial da carcaça é menos visível nesta superfície.

Material e métodos

Recolha das amostras

O presente estudo foi efectuado num matadouro de suínos na Região Norte de Portugal. Foram efectuadas 6 visitas, durante 6 semanas consecutivas, procedendo-se, em cada visita, à recolha de amostras em 6 carcaças (excepto na última na qual se avaliaram 8 carcaças), perfazendo um total de 38 carcaças. Este procedimento decorreu a meio do abate antes da entrada das carcaças no túnel de refrigeração, de acordo com o procedimento descrito na Decisão Europeia 2001/471/CE.

Os quatro locais de amostragem na superfície externa da carcaça foram os descritos na Decisão Europeia 2001/471/CE: barriga, presunto, queixada, lombo (Figura 1). As amostras foram recolhidas pela técnica da zaragatoa dupla e pela técnica de excisão em locais contíguos. Os quatro locais de amostragem da superfície interna (Figura 2), seleccionados pela sua relação anatómica com os da superfície externa, também foram avaliados pelas duas técnicas.

A área de cada local de amostragem submetida à técnica de excisão foi de 5 cm² por, aproximadamente 3mm de profundidade, e foi definida por uma bitola de plástico esterilizada. As quatro amostras de cada superfície, foram recolhidas assepticamente com o auxílio de um bisturi e de uma pinça e colocadas num único contentor esterilizado. A área total de cada superfície (interna ou externa) avaliada foi de 20 cm², tendo sido processada posteriormente como uma única amostra.

A área da superfície a avaliar pelo método de zaragatoa (100 cm²) foi delimitada por uma bitola esterilizada. Utilizou-se em primeiro lugar uma zaragatoa esterilizada humedecida em água peptonada e, subsequentemente, uma zaragatoa seca. Ambas as zaragatoas foram recolhidas para um tubo que continha 5

ml de água peptonada. A área total de cada superfície (interna ou externa) avaliada foi de 400 cm², tendo sido processada posteriormente como uma única amostra.

Procedimentos bacteriológicos

O exame bacteriológico foi executado entre a segunda e a quarta hora subsequente à recolha das amostras.

No laboratório, adicionaram-se 100 ml de água peptonada esterilizada às quatro amostras de cada superfície recolhidas pelo método de excisão. Os tubos que continham as zaragatoas eram vigorosamente agitados e adicionaram-se posteriormente 95 ml de água peptonada esterilizada. As amostras diluídas eram, subsequentemente, maceradas num *Stomacher* durante 120 segundos.

Efectuaram-se cinco diluições decimais, as quais foram semeadas por incorporação em placas com: i) PCA (Plate Count Agar - Difco - 0479), incubadas durante três dias a 30 °C, para determinação de CTV, de acordo com a Norma Portuguesa NP - 1995 (Anónimo, 1983); ii) VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar - Oxoid CM 485) incubadas durante um dia a 37°C, para determinação de *Enterobacteriaceae*, de acordo com a norma ISO 5552/1997 (ISO, 1997). A contagem e selecção das colónias foi efectuada de acordo com a mesma norma.

Análise estatística dos dados obtidos

Os valores das Unidades Formadoras de Colónias (UFC) por cm² foram convertidos em logaritmo na base 10. Antes de se passar a análise dos resultados, procedeu-se ao estudo da normalidade e independência das variáveis (Daniel, 1987 e Reis, 1997), tendo-se

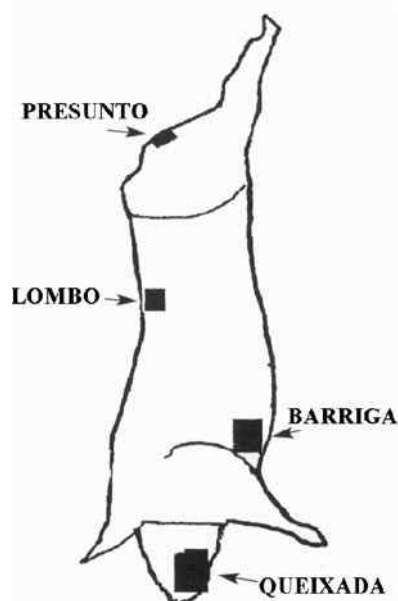


Figura 1 – Locais de amostragem da superfície externa da carcaça de suíno (Fonte: Decisão Europeia 2001/471/CE).

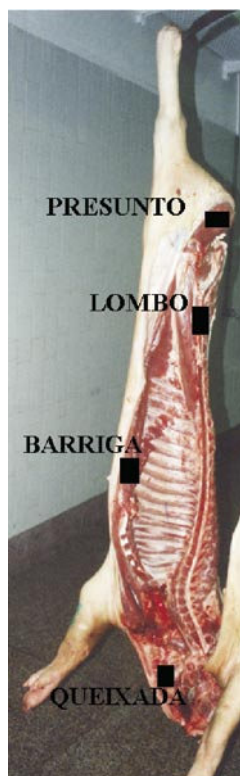


Figura 2 – Locais de amostragem da superfície interna da carcaça de suíno.

concluído que ambos os pressupostos se verificavam. A diferença entre as médias dos resultados da técnica de excisão e da zaragatoa dupla, e das superfícies interna e externa da carcaça foi avaliada através do teste *t* de Student. Posteriormente, calculou-se a correlação e ajustou-se uma equação de regressão entre os dois métodos, a fim de avaliar a possibilidade de estimar valores para o método de excisão a partir dos obtidos pelo método de zaragatoa.

Resultados

O processamento das amostras obtidas da superfície interna e externa de 38 carcaças de suíno, e o tratamento dos resultados obtidos, permitiu-nos calcular a média e o desvio padrão relativos aos valores de CTV e de *Enterobacteriaceae*, os quais se encontram referidos na Tabela 2.

A análise da diferença, suportada pelo teste *t* de Student (Daniel, 1987; Reis, 1997), entre os valores obtidos pelo método de excisão e o da zaragatoa, para estimar os valores de CTV e de *Enterobacteriaceae* na

superfície interna e externa da carcaça, revelou que o método de excisão apresentava valores superiores das duas determinações bacteriológicas nas superfícies interna e externa da carcaça, em relação ao método da zaragatoa, sendo esta diferença altamente significativa ($P < 0,001$).

Através da análise de regressão, estudou-se o ajustamento de três tipos de regressão; linear, quadrático e exponencial, tendo-se verificado que o modelo exponencial foi o que conduziu a resultados mais significativos. As equações ajustadas permitiram verificar que se pode estimar a variação da contaminação determinada pelo método de excisão recorrendo a valores obtidos pelo método de zaragatoa. Os resultados foram significativos para as determinações de CTV ($r^2=0,103$; $P=0,0483$) e de *Enterobacteriaceae* ($r^2=0,155$; $P=0,0144$) sobre a superfície externa, e altamente significativos para as determinações de CTV ($r^2=0,413$; $P<0,001$) e de *Enterobacteriaceae* ($r^2=0,445$; $P<0,001$) sobre a superfície interna. As equações de regressão ajustadas entre os dois métodos estão apresentadas nas Figuras 3 e 4.

A comparação entre os valores das determinações de CTV e de *Enterobacteriaceae* na superfície externa e interna através do teste *t* de Student, indicou-nos que: i) quando o método da zaragatoa era usado, os valores de CTV na superfície interna eram inferiores aos obtidos na externa, sendo esta diferença muito significativa ($P < 0,01$), mas, quando o método de excisão era usado, não se verificava nenhuma diferença significativa ($P > 0,05$) entre os valores obtidos para as duas superfícies da carcaça avaliadas; ii) não se verificou nenhuma diferença significativa ($P > 0,05$) entre os valores de *Enterobacteriaceae* da superfície interna e externa da carcaça quando o método da zaragatoa era usado, mas, com o método de excisão, esta diferença revelou-se significativa ($P < 0,05$), apresentando a superfície interna valores superiores de *Enterobacteriaceae* em relação aos da superfície externa.

Discussão

Os valores de CTV e de *Enterobacteriaceae* obtidos neste estudo (Tabela 2) estão de acordo com os apresentados anteriormente por Snijders *et al.* (1984), Morgan *et al.* (1985), Swanenburg (2000) e Ventura (2002). Em todas as determinações efectuadas, o

Tabela 1 - Valores médios aceitáveis, marginais e inaceitáveis de contaminação bacteriológica de carcaças de bovinos, suínos, ovinos, caprinos e equinos (\log_{10} ufc/cm²) para amostras colhidas através do método destrutivo (Decisão da Comissão 2001/471/CE de 8 de Junho de 2001).

	Nível aceitável (\log_{10} ufc/cm ²)		Nível marginal ($> m$ e $\leq M$) (\log_{10} ufc/cm ²)		Nível inaceitável ($> M$) (\log_{10} ufc/cm ²)	
	Bovinos/ovinos/ caprinos/equinos	Suínos	Bovinos/ovinos/ caprinos/equinos	Suínos	Bovinos/ovinos/ caprinos/equinos	Suínos
Contagens totais viáveis (CTV)	< 3,5	< 4,0	3,5 a 5,0	4,0 a 5,0	> 5,0	
<i>Enterobacteriaceae</i>	< 1,5	< 2,0	1,5 a 2,5	2,0 a 3,0	> 2,5	> 3,0

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos logaritmos (\log_{10} ufc/cm²) dos valores de CTV e de *Enterobacteriaceae*.

Técnica de amostragem	Contagem Totais Viáveis (\log_{10} ufc/cm ²)		Enterobacteriaceae (\log_{10} ufc/cm ²)	
	Superfície Interna	Superfície Externa	Superfície Interna	Superfície Externa
Excisão	3,8±0,5	3,9±0,4	2,0±0,6	1,7±0,5
Zaragatoa	2,4±0,5	2,9±0,4	0,6±0,3	0,7±0,5

método de excisão conduziu a valores superiores em relação ao método da zaragatoa, sendo esta diferença altamente significativa ($P < 0,001$). Estes resultados estão de acordo com estudos prévios efectuados por Nortje *et al.* (1982), Snijders *et al.* (1984), Morgan *et al.* (1985), Anderson *et al.* (1987), Fliss *et al.* (1991), Zeleke *et al.* (1994), Gill e Jones (2000), Swanenburg (2000) e Gill *et al.* (2001). Segundo Snijders *et al.* (1984) este facto deve-se à aderência das bactérias à pele. Para estes autores a técnica de excisão deve ser considerada como a mais eficaz devido à sua elevada sensibilidade e precisão. Mas, por outro lado, esta técnica danifica a carcaça, necessita de mais tempo para ser executada e apenas permite analisar uma pequena área (Anderson *et al.*, 1987; Swanenburg, 2000). De acordo com Morgan *et al.* (1985) 5 cm é o diâmetro máximo que deve ser utilizado no método de excisão.

Apesar da menor sensibilidade do método da zaragatoa na remoção de bactérias da superfície da carne, este é o método mais utilizado para determinar valores de contaminação bacteriana em carne e outras superfícies, uma vez que é simples e não é destrutivo (Morgan

et al., 1985). Scholefield *et al.* (1981) cit. por Morgan *et al.* (1985) acrescenta que o método de recolha de amostras para avaliar a contaminação bacteriológica de carcaças deve ser simples, não destrutivo, reproduzível e económico (como é o caso da zaragatoa). No entanto, os valores de referência dos níveis aceitável e inaceitável de contaminação (CTV e *Enterobacteriaceae*) da superfície das carcaças, definidos na Decisão Europeia 2001/471/CE, são apenas aplicáveis para amostras recolhidas pelo método de excisão.

Considerando todos estes factos relativos aos dois métodos de amostragem e, uma vez que as equações de regressão ajustadas neste trabalho entre estes dois métodos conduziram a resultados mais significativos para a superfície interna do que para a externa, como se apresentou nas figuras 3 e 4, sugere-se a utilização da equação de regressão para estimar os valores para o método de excisão sobre a superfície interna a partir de valores obtidos pelo método de zaragatoa.

Analisando a distribuição dos valores e as equações de regressão, verificou-se que os erros de estimativa apresentavam uma distribuição aleatória, pelo que

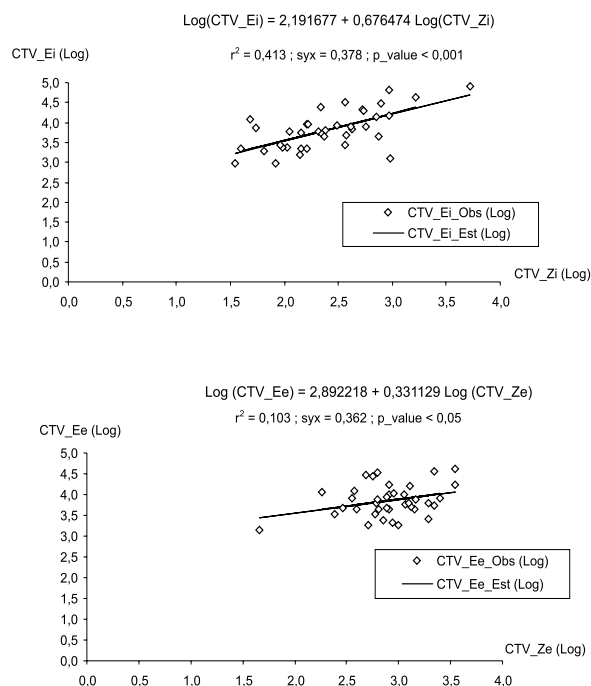


Figura 3 – Equações de regressão ajustadas entre o método da zaragatoa e o da excisão, para as determinações de CTV nas superfícies interna e externa. Ei – Excisão na superfície interna; Ee –Excisão na superfície externa; Est – valor estimado; Obs – Observados; Ze –Zaragatoa na superfície externa; Zi –Zaragatoa na superfície interna; CTV – Contagem de Microrganismos Totais Viáveis

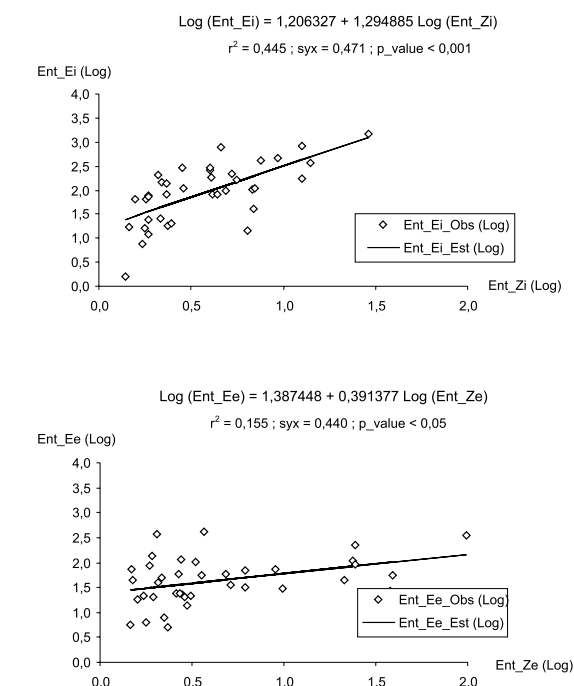


Figura 4 – Equações de regressão ajustadas entre o método da zaragatoa e o da excisão, para as determinações de *Enterobacteriaceae* nas superfícies interna e externa. Ei – Excisão na superfície interna; Ee –Excisão na superfície externa; Est – valor estimado; Obs – Observados; Ze –Zaragatoa na superfície externa; Zi –Zaragatoa na superfície interna; Ent – *Enterobacteriaceae*.

estas podem ser utilizadas em toda a amplitude dos intervalos de valores.

Refira-se, ainda, que é possível melhorar a sensibilidade do método da zaragatoa aumentando a área de amostragem (Swanenburg, 2000) e adicionando à zaragatoa detergentes não iónicos a 1%, tais como Tween 80 ou Trion X-100, os quais promovem o destacamento das bactérias que estiverem aderidas à superfície da carcaça (Fliss *et al.*, 1991). Acerca deste assunto Dorsa *et al.* (1996) já tinham descrito que quanto mais abrasivo for o material que constitui a zaragatoa, mais os resultados alcançados por este método se aproximam dos alcançados pelo método de excisão.

O facto de termos encontrado uma diferença significativa entre os valores de CTV obtidos para a superfície interna e a externa quando foi utilizado o método da zaragatoa, a qual não se verificou quando o método de excisão foi aplicado, pode ter sido devido à maior dificuldade de remoção dos microrganismos da superfície da carne (superfície interna) comparativamente com a superfície da pele (superfície externa). De acordo com Ingram e Roberts (1976) a pele escaldada da carcaça de suíno apresenta características que permitem que a zaragatoa recolha um maior número de microrganismos comparativamente com a superfície da carne.

Neste estudo também se constatou que a superfície interna da carcaça apresentava valores superiores de *Enterobacteriaceae* em relação à externa, quando era aplicado o método de excisão, tendo sido esta diferença significativa ($P < 0,05$). Nos alimentos de origem animal a maior parte das *Enterobacteriaceae* são provenientes de contaminações de origem fecal (ICMSF, 2000) e, segundo Berends *et al.* (1996), a evisceração é a principal etapa do processo de abate que conduz a um aumento destes microrganismos na superfície da carcaça. Este facto pode explicar os resultados obtidos neste estudo, uma vez que os erros na evisceração afectam mais o nível de contaminação de origem fecal da superfície interna da carcaça do que o da superfície externa.

Uma vez que, neste estudo, se constatou que: i) não existia diferença significativa entre os valores de CTV para a superfície interna e externa da carcaça, quando era utilizado o método de excisão; ii) o nível de contaminação da carcaça por *Enterobacteriaceae* era significativamente maior ($P < 0,05$) na superfície interna do que na externa, quando aplicado o método de excisão; iii) o dano visível na apresentação comercial da carcaça, provocado pelo método de excisão, foi menor na superfície interna do que na externa, consideramos que a superfície interna da carcaça pode constituir uma alternativa à superfície externa para aplicação do método de excisão na avaliação bacteriológica de carcaças de suíno, de acordo com o definido na Decisão da Comissão 2001/471/CE de 8 de Junho de 2001. A este respeito julgamos importante acrescentar que esta Decisão prevê a utilização de outras partes da carcaça

como locais de amostragem alternativos sempre que: “... devido à tecnologia de abate numa determinada unidade se demonstre que possam existir outros pontos com níveis de contaminação mais elevados. Nestes casos, podem ser escolhidos esses pontos com níveis mais elevados de contaminação.”

Bibliografia

- Anderson, M.E., Huff, H.D., Naumann, H.D., Marshall, R.T., Damare, J., Johnston, R. e Pratt, M. (1987). Evaluation of swab and tissue excision methods for recovering microorganisms from washed and sanitized beef carcasses. *Journal of Food Protection*, 50 (9), 741-743.
- Anónimo (1983). Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de microrganismos a 30°C. NP-1995. Portugal.
- Berends, B.R., Snijders, J.M.A. e Van Knapen, F. (1996). A risk assessment approach for control of *Salmonella* and other pathogens on pork. *Proceedings of the Concerted Action CT94-1456. Microbial Control in the Meat Industry*. Volume 2, Perugia, Italy.
- Comunidade Europeia. Decisão da Comissão nº 2001/471/CE de 8 de Junho. Jornal das Comunidades nº L 165/48 de 21 de Junho de 2001.
- Cordray, J.C. e Huffman, D.L. (1985). Comparison of three methods for estimating surface bacteria on pork carcasses. *Journal of Food Protection*, 48 (7), 582-584.
- Daniel, W.W. (1987). *Biostatistics, A foundation for analysis in the health sciences*. Fourth Edition. John Wiley e Sons.
- Dorsa, W.J., Cutter, C.N. e Siragusa, G.R. (1996). Evaluation of six sampling methods for recovery of bacteria from beef carcass surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 22, 39-41.
- Fliss, I., Simard, R.E. e Etriki, A. (1991). A comparison of three sampling techniques for microbiological analysis of meat surfaces. *Journal of Food Science*, 56 (1), 249-251.
- Gill, C.O. e Jones, T. (2000) Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *Journal of Food Protection*, 63 (2), 167-73.
- Gill, C.O., Badoni, M. e McGinnis, J.C. (2001). Microbiological sampling of meat cuts and manufacturing beef by excision or swabbing. *Journal of Food Protection*, 64 (3), 325-34.
- Ingram, M. e Roberts, T.A. (1976) The microbiology of the red meat carcass and the slaughterhouse. *Royal Society of Health Journal*, 96, 270-276.
- ICMSF (2000) *Microorganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración*. Volumen 1. 2ª Edición. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza.
- ISO (1997). *Meat and meat products – Deception enumeration of Enterobacteriaceae without resuscitation – MPN technique and colony-count technique*. ISO 5552, 1997 (E). Second edition
- Morgan, I.R., Krautil, F. e Craven, J.A. (1985). A comparison of swab and maceration methods for bacterial sampling of pig carcasses. *J. Hyg. Camb*, 95, 383-390.
- Nortje, G.L., Swanepoel, E., Naude, R.T., Holzapfel, W.H. e Steyn, P.L. (1982). Evaluation of Three Carcass Surface Microbial Sampling Techniques. *Journal of Food Protection*, 45 (11), 1016-1021.
- Niskanen, A. e Pohja, M.S. (1977). Comparative studies on the sampling and investigation of microbial contamination of surfaces by the contact plate and swab methods. *Journal of Applied Bacteriology*, 42, 53-63.
- Reis, E. (1997). *Estatística Multivariada Aplicada*. Edições Sílabo, Lda..
- Snijders, J.M.A., Janssen, M.H.W., Gerats, G.E. e Cortiaensen, G.P. (1984). A comparative study of sampling techniques for

- monitoring carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 1, 229-236.
- Sholefield, J., Menon, T.G. e Lam, C.W. (1981). Psychrotroph contamination of pig carcasses. *Report of 27th European Congress of Meat Research Workers*, 2, 621-624, Vienna.
- Swanenburg, M. (2000). *Salmonella* in the pork production chain, sources of *Salmonella* on pork. *Thesis*, University of Utrecht.
- Troeger, K. (1994). Evaluating hygiene risks during slaughtering. *Fleischwirtsch*, 74 (6), 624-626.
- Untermann, F., Stephan, R., Dura, U., Hofer, M. e Heimann, P. (1996). Realibility and practicability of bacteriological monitoring of beef carcass contamination and their rating within a hygiene quality control programme of abattoirs. *Proceedings of the Concerted Action CT94-1456. Microbial Control in the Meat Industry*, Volume 2, Perugia, Italy.
- Veloso, G. (2000). Microbiologia das carnes. In: *Manual de Inspeção Sanitária de Carnes*, I Volume, 2ª Edição. Editores: J. I. Gil. Fundação Calouste Gulbenkian, 251-279
- Ventura, F.I.L. (2002). Estudo da contaminação microbiana em carcaças de suíno na linha de abate. *Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Instituto Superior Técnico. Lisboa.
- Zeleke, M., Ellerbroek, L., Weise, E., Arndt, G. e Zessin, K. (1994). The application of the hazard analysis critical control point concept to a cattle slaughter line. *Fleischwirtsch*, 74 (7), 735-737.

Ação de antimicrobianos sobre estirpes de *Aeromonas* isoladas em diferentes pontos da linha de processamento de frangos

Action of antimicrobial in *Aeromonas* strains isolated at different places of the processing poultry plant

Francisca Neide Costa^{1*}, Oswaldo Durival Rossi Júnior² e Luiz Augusto do Amaral²

¹Departamento de Patologia, Escola de Veterinária – UEMA, São Luís-MA

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, FCAV-UNESP, via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, Cep: 14884-900 Jaboticabal-SP, Brasil

Resumo: Investigou-se o comportamento de 57 estirpes de bactérias do gênero *Aeromonas*, obtidas de penas, fezes, carcaças não evisceradas, evisceradas e refrigeradas e água do pré-arrefecimento colhidas num matadouro de frangos, desafiadas com 12 antimicrobianos de uso comum. Do total de estirpes testadas, 100% foram resistentes à ampicilina, 75,43% à cefalotina, 75,0% à tetraciclina e 45,61% ao sulfazotrim. Os compostos antibacterianos frente aos quais as estirpes se mostraram mais sensíveis foram: netilmicina, gentamicina, tobramicina e amicacina, com mais de 70,0% de sensibilidade. A resistência a múltiplos princípios activos foi observada em 96,5% das estirpes. Realça-se a importância do conhecimento da susceptibilidade antimicrobiana da *Aeromonas* spp. para a prática terapêutica.

Palavras-chaves: *Aeromonas* spp., matadouro de frangos, antimicrobianos, resistência a antibióticos.

Summary: The behaviour of 57 strains of bacteria of *Aeromonas* genus isolated from feather, stools, pre-evisceration, post-evisceration and cooled carcasses and chill tank water samples collected in poultry slaughterhouses was investigated for drug sensitivity using 12 antimicrobial of common use. Of the 57 strains analysed, 100.0%, were resistant to ampicillin, 75.4% to cephalothin, 75.0% to tetracycline and 45.61% to sulfazothrim. The strains showed more susceptibility to netilmicin, gentamicin, tobramycin and amikacin, with more than 70.0% of sensitivity. The antibiotic multiresistance was observed in 96.5% of the strains. These results indicate the importance of knowing the antimicrobial susceptibility of the *Aeromonas* spp. for the practice of therapeutics.

Keywords: *Aeromonas* spp., slaughtered poultry, antimicrobial, antibiotics resistance.

Introdução

Pesquisas realizadas com estirpes de *Aeromonas* isoladas de fontes ambientais, alimentos e espécimes clínicos, mostraram que essa bactéria pode apresentar resistência múltipla a drogas. Barnhart e Pancorbo

(1992) verificaram resistências múltiplas a antibióticos, ressaltando que, de 119 isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de carcaças de frango e da água de lavagem das carcaças em diferentes pontos da planta de processamento, 46,0% apresentaram resistência a vários princípios, sendo que, deste total, 76,3% foram resistentes à ampicilina e à cefalotina e 23,6% das estirpes foram resistentes a dois, três ou quatro princípios, em combinações diferentes.

Singh e Sanyal (1994) também observaram essa característica em estirpes isoladas de fezes de diferentes espécies de animais domésticos e do homem, sendo menos eficazes a ampicilina, a amoxicilina, a carbenicilina e a estreptomina. A esse respeito Nociti *et al.* (1999), trabalhando com estirpes isoladas de alimentos de origem animal, verificaram uma resistência elevada frente a ação da ampicilina, da cefalotina, da eritromicina, da polimixina B e do sulfametoxazol.

As *Aeromonas* estão associadas a infecções humanas oportunistas e têm a capacidade de apresentar resistência múltipla a drogas. Entretanto, no Brasil, pouco se conhece a respeito do comportamento das *Aeromonas* frente à ação de antimicrobianos de uso comum. Frente ao exposto, idealizou-se a presente pesquisa com o objetivo de verificar o comportamento de estirpes de *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandae*, *A. trota* e *A. schubertii*, isoladas na linha de processamento de frangos, desafiadas por antimicrobianos de uso comum e contribuir com informações que auxiliem no tratamento de infecções humana e animal.

Material e métodos

Foram utilizadas 57 estirpes de *Aeromonas* isoladas de amostras de penas, fezes, carcaças não evisceradas, evisceradas e resfriadas e água do pré-resfriamento colhidas em um abatedouro de frangos submetido a

* Correspondência: Avenida da Paz, S/N Condomínio Rei Salomão V Bloco B Apto. 301 Bairro: Parque Shalom Cep: 65072-570 São Luís -MA. Telefone: (+98) 2482780 / 2452688; e-mail: franeidec@yahoo.com.br / franciscacosta@cca.uema.br

controle higiênico-sanitário permanente. Para a realização do teste de sensibilidade, as estirpes de *Aeromonas* pertencentes às espécies *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. trota*, *A. jandaei* e *A. schubertii* foram submetidas à ação de antimicrobianos de uso comum, segundo a metodologia recomendada por Bauer *et al.* (1966). As culturas foram repicadas em tubos contendo 5 mL de caldo tripticase soja e incubadas a 37 °C por 18 a 20 horas. Após a incubação, alíquotas das culturas foram gotejadas, de forma asséptica, em tubos contendo 4 mL de solução salina esterilizada, até a obtenção de turvação idêntica à da solução padrão de cloreto de bário, preparada pela adição de 0,5 mL de uma solução 0,048 M de cloreto de bário a 99,5 mL de ácido sulfúrico a 1% (v/v). A seguir, as culturas diluídas foram semeadas, com auxílio de zaragoas esterilizadas, em placas com Ágar Mueller-Hinton (Difco) e, após aproximadamente 3 minutos, tempo necessário à secagem da superfície do meio, foram colocados os discos (Polidiscos – Laborclin) contendo os antimicrobianos. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação a 37 °C, através da medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimétrica. Os diâmetros, obtidos em milímetros, foram comparados com a tabela fornecida pelo fabricante dos discos utilizados.

Foram utilizados, para cada uma das estirpes testadas, dois discos, cada um contendo 6 antimicrobianos: aztreonam (30 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefotaxima (30 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), netilmicina (30 µg), sulfazotrim (25 µg), tetraciclina (30 µg) e tobramicina (10 µg).

Resultados

Pelos dados apresentados na Tabela 1 verifica-se que o princípio activo com maior percentual de estirpes

resistentes foi a ampicilina (100%), seguida pela cefalotina (75,43%), pela tetraciclina (75,0%) e pelo sulfazotrim (45,61%). Quanto à sensibilidade das estirpes verificou-se que 89,47% delas foram sensíveis à netilmicina, 82,45% à gentamicina, 75,43% à tobramicina, 71,92% à amicacina, 68,42% à cefoxitina e 50,87% ao cloranfenicol.

Os dados da Tabela 2 mostram que 85,7% das estirpes da espécie *A. hydrophila* foram resistentes à cefalotina e 78,5% à tetraciclina. Quanto à sensibilidade das estirpes de *A. hydrophila* 92,8% foram sensíveis à netilmicina, 78,5% à tobramicina e gentamicina, 71,4% ao sulfazotrim, 64,2% à amicacina, 57,7% à cefoxitina e 57,1% ao cloranfenicol. Quanto às estirpes da espécie *A. caviae* verificou-se, que a maior resistência foi observada frente à ampicilina (100%), seguida pela cefalotina (93,7%), tetraciclina (81,2%) e sulfazotrim (56,2%) e a maior sensibilidade frente à netilmicina (87,5%), à gentamicina (81,2%), à tobramicina e cefoxitina (68,7%), amicacina (62,5%) e cloranfenicol (56,2%).

As estirpes da *Aeromonas sobria* apresentaram taxas de resistência mais elevadas à ampicilina (100%), tetraciclina (85,7%) e à cefalotina (64,3%) e maior sensibilidade à netilmicina (92,8%), à gentamicina (85,7%), à amicacina (78,6%), à cefoxitina, cefotaxima e tobramicina (71,4%), ao aztreonam (64,3%) e ao cloranfenicol (57,7%).

Quanto às estirpes de *Aeromonas veronii*, verificou-se que as maiores taxas de resistência foram à ampicilina (100%), ao sulfazotrim (60,0%), à cefalotina, ao cloranfenicol e à tetraciclina (50,0%) e a maior susceptibilidade ao aztreonam. Salienta-se, também que as estirpes de *A. jandaei* e *A. trota* expressaram resistências à tetraciclina, ao cloranfenicol, ao sulfazotrim, à ampicilina e à cefalotina e sensíveis à netilmicina, ao aztreonam, à gentamicina, à cefotaxina, à tobramicina e à cefoxitina. *A. schubertii* foi resistente ao aztreo-

Tabela 1 - Comportamento de 57 estirpes de *Aeromonas* isoladas de diferentes pontos da cadeia de abate de frangos desafiadas por 12 antimicrobianos de uso comum, Jaboticabal-SP, 2000.

Antimicrobianos	Número de estirpes			TOTAL
	Resistente	Sensível	Intermédio	
Aztreonam	15 (26,78%)	30 (52,63%)	12 (21,42%)	57
Amicacina	06 (10,52%)	41 (71,92%)	10 (17,54%)	57
Ampicilina	57 (100%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	57
Cefalotina	43 (75,43%)	09 (15,78%)	05 (8,77%)	57
Cefoxitina	10 (17,54%)	39 (68,42%)	08 (14,03%)	57
Cefotaxima	12 (21,05%)	28 (49,12%)	17 (29,82%)	57
Cloranfenicol	17 (29,82%)	29 (50,87%)	11 (19,29%)	57
Gentamicina	5 (8,77)	47 (82,45%)	05 (8,77)	57
Netilmicina	04 (7,01%)	51 (89,47%)	02 (3,5%)	57
Sulfazotrim	26 (45,61%)	27 (47,36%)	04 (7,01%)	57
Tetraciclina	42 (75,00%)	10 (17,85%)	04 (7,01%)	57
Tobramicina	10 (17,54%)	43 (75,43%)	04 (7,01%)	57

Tabela 2 - Distribuição das estirpes de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* e *Aeromonas veronii* isoladas em diferentes pontos da cadeia de abate de frangos, segundo seu comportamento face à acção de antimicrobianos, Jaboticabal-SP, 2000.

Anti ¹	<i>Aeromonas hydrophila</i>		<i>Aeromonas caviae</i>		<i>Aeromonas sobria</i>		<i>Aeromonas veronii</i>	
	R ²	S	R	S	R	S	R	S
ATM	04(28,6) ³	08(57,1)	04(25,0)	5(31,2)	04(28,6)	09(64,3)	04(40,0)	08(80,0)
AMI	03(21,4)	09(64,2)	03(18,7)	10(62,5)	01(7,1)	11 (78,6)	00(0,0)	02(20,0)
AMP	14(100,0)	00(0,00)	16(100,0)	00(0,00)	14(100,0)	00 (0,00)	10(100,0)	00(0,0)
CFL	12(85,7)	02(14,2)	15(93,7)	00(0,00)	09(64,3)	04(28,6)	5(50,0)	03(30,0)
CFO	02(14,2)	08(57,7)	02(12,5)	11(68,7)	03(21,4)	10(71,4)	03(30,0)	00(0,00)
CTX	03(21,4)	06(42,8)	03(18,7)	07(43,7)	01(7,1)	10(71,4)	04(40,0)	02(20,0)
CLO	04(28,5)	08(57,1)	05(31,2)	09(56,2)	02(14,3)	08(57,7)	05(50,0)	03(30,0)
GEN	01(7,1)	11(78,5)	02 (12,5)	13(81,2)	02(14,3)	12(85,7)	00(0,00)	01(10,0)
NET	00(0,0)	13 (92,8)	02(12,5)	14(87,5)	01(7,1)	13(92,8)	01(10,0)	01(10,0)
SUT	04(28,5)	10(71,4)	09(56,2)	05(31,2)	04(28,6)	08(57,1)	06(60,0)	00(0,00)
TET	11(78, 5)	02(14,2)	13 (81,2)	02(12,5)	12(85,7)	02(14,3)	05(50,0)	02(20,0)
TOB	02(14,28)	11 (78,5)	05(31,2)	11(68,7)	02(14,3)	10(71,4)	01(10,0)	00(0,00)

¹Antimicrobianos: aztreonam (ATM), amicacina (AMI), ampicilina (AMP), cefalotina (CFL), cefoxitina (CFO), cefotaxima (CTX), cloranfenicol (CLO), gentamicina (GEN), netilmicina (NET), sulfazotrim (SUT), tetraciclina (TET) e tobramicina (TOB)

²R - resistente; S - sensível ³Porcentagem em relação ao total de estirpes da espécie

nam, ao sulfazotrim, à cefotaxima, à ampicilina e à cefalotina e sensíveis à tetraciclina, ao cloranfenicol, à gentamicina, à tobramicina e à cefoxitina.

Os dados da Tabela 3 evidenciam a ocorrência de resistências a múltiplos princípios activos, mostrando que 96,5% das estirpes expressaram a dois ou mais princípios. Dos 14 isolados de *Aeromonas hydrophila* submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, 50,0% apresentaram resistência a quatro princípios e

14,3% a até sete princípios em combinações diferentes. Quanto aos isolados de *A. caviae* testadas, verifica-se que um (6,3%) deles foi resistente a nove princípios, três (18,8%) foram resistentes a cinco princípios e quatro (25,0%) a quatro princípios. Dos 14 isolados de *A. sobria* submetidos ao teste, três (21,42%) foram resistentes a dois princípios, sete (50,0%) a três princípios e um (7,14%) aos doze princípios testados. As estirpes da espécie *A. veronii* apresentaram 30,0% de

Tabela 3 - Distribuição das espécies de *Aeromonas* isoladas em diferentes pontos da cadeia de abate de frangos, em relação ao número de antimicrobianos a que se mostraram resistentes, Jaboticabal-SP, 2000.

Resistência (Princípios) ¹	Espécies de <i>Aeromonas</i>							Total geral
	<i>A hydrophila</i> (nº de estirpes)	<i>A caviae</i> (nº de estirpes)	<i>A sobria</i> (nº de estirpes)	<i>A veronii</i> (nº de estirpes)	<i>A jandae</i> (nº de estirpes)	<i>A trota</i> (nº de estirpes)	<i>A schubertii</i> (nº de estirpes)	
ATM	02 (14,28) ²							02 (3,50) ³
AMI		01 (6,25)	03 (21,42)	03 (30,00)			1 (100,00)	08 (14,03)
AMP	01 (7,14)	03 (18,75)	07 (50,00)	02 (20,00)				13 (22,80)
CFL	07 (50,00)	04 (25,00)	01 (7,14)	01 (10,00)		1 (100,00)		14 (24,56)
CFO	01 (7,14)	03 (18,75)	01 (7,14)		1 (100,00)			06 (10,52)
CTX	01 (7,14)	01 (6,25)	01 (7,14)					03 (5,26)
CLO	02 (14,28)	02 (12,5)		04 (40,00)				08 (14,03)
GEN		01 (6,25)						01 (1,75)
NET		01 (6,25)						01 (1,75)
SUT								
TET								
TOB			01 (7,14)					01 (1,75)
Total	14 (100,00)	16 (100,00)	14 (100,00)	10 (100,00)	1(100,00)	1 (100,00)	1 (100,00)	57(100)

¹Antimicrobianos: aztreonam (ATM), amicacina (AMI), ampicilina (AMP), cefalotina (CFL), cefoxitina (CFO), cefotaxima (CTX), cloranfenicol (CLO), gentamicina (GEN), netilmicina (NET), sulfazotrim (SUT), tetraciclina (TET) e tobramicina (TOB).

²Porcentagem de estirpes resistentes em relação ao total de estirpes da espécie testada

³Porcentagem de estirpes resistentes em relação ao total geral de estirpe testadas

resistência a dois princípios, 20,0% a três e 40,0% a até sete princípios. Já *A. jandaei* foi resistente a cinco princípios, *A. trota* a quatro princípios e *A. schubertii* a dois princípios.

Discussão

Os resultados apresentados na Tabela 1 são semelhantes aos encontrados por Hassani *et al.* (1992) que analisando estirpes isoladas de água de consumo, em Marrocos, encontraram 73,0% de estirpes resistentes à cefalotina. Já Obi *et al.* (1995), trabalhando com isolados clínicos de diarreia, na Nigéria, verificaram que a taxa de resistência à tetraciclina foi superior a 88,0% e Rossi Júnior *et al.* (2000) detectaram 66,7% e 33,3% de estirpes de *Aeromonas* isoladas em diferentes pontos da cadeia de abate de bovinos, resistentes à cefalotina e à tetraciclina, respectivamente.

Quanto à sensibilidade das estirpes (Tabela 1) os resultados encontrados são semelhantes de Jindal *et al.* (1993), que trabalhando com estirpes isoladas de bovinos e aves, na Índia, verificaram sensibilidade ao cloranfenicol e aos referidos por Ko e Chuang (1995), na China, que observaram sensibilidade elevada à amicacina e ao cloranfenicol e também aos achados obtidos por Rossi Júnior *et al.* (2000) que verificaram mais de 70% de estirpes sensíveis à gentamicina, à tobramicina, à amicacina e à netilmicina.

Quanto à resistência das estirpes da espécie *A. hydrophila* (Tabela 2) frente à cefalotina e à tetraciclina os dados da presente pesquisa são superiores aos encontrados por Gray (1984) que testou estirpes de *A. hydrophila* isoladas de bovinos, suínos e eqüinos e detectou apenas 4,6% de estirpes resistentes à tetraciclina e, também ao contrário dos resultados do presente estudo, Rossi Júnior *et al.* (2000) detectaram 27,8% de resistência à cefalotina e à tetraciclina. Entretanto, os achados aqui apresentados são próximos dos de Hassani *et al.* (1992) que, ao testarem 24 estirpes de *A. hydrophila* verificaram que 96% delas eram resistentes à cefalotina.

A sensibilidade apresentada pelas estirpes de *A. hydrophila* (Tabela 2) frente à netilmicina, tobramicina, gentamicina, amicacina, cefoxitina e ao sulfazotrim e cloranfenicol foi semelhante a encontrada por Rossi Júnior *et al.* (2000) em que 100% das estirpes das estirpes da espécie *A. hydrophila* foram sensíveis à gentamicina, à amicacina e tobramicina, 88,8% à cefoxitina, 83,3% à netilmicina e 77,8% ao cloranfenicol e ao sulfazotrim.

Quanto a resistência e sensibilidade das estirpes da espécie *A. caviae* frente à ampicilina, cefalotina, tetraciclina, netilmicina, gentamicina, tobramicina, cefoxitina, amicacina e ao sulfazotrim e cloranfenicol (Tabela 2), os dados encontrados podem ser comparados aos de Hassani *et al.* (1992) que encontraram 4% das estirpes de *Aeromonas caviae* resistentes ao cloranfenicol e 91,0% à cefalotina. Já Rossi Júnior *et al.* (2000)

encontraram maior sensibilidade dessa espécie frente à gentamicina (92,3%), seguido da tobramicina (80,0%), da amicacina (76,9%), da netilmicina (73,8%) e do cloranfenicol (72,3%) e maior resistência à cefalotina (72,3%), achados semelhantes aos encontrados na presente pesquisa. Freitas *et al.* (1993) encontraram estirpes de *A. caviae* resistentes à cefalotina e sensíveis ao cloranfenicol, gentamicina, amicacina e tobramicina.

Os resultados encontrados das estirpes da *Aeromonas sobria* (Tabela 2) podem ser comparados aos encontrados por Rall *et al.* (1998) que ao testarem estirpes de *A. sobria* isoladas de peixes, observaram 100% de sensibilidade à tetraciclina, ao cloranfenicol, à gentamicina e à cefoxitina e 17,0% à cefalotina; Hassani *et al.* (1992) que verificaram 100% das estirpes de *A. sobria* sensíveis ao cloranfenicol e 9% resistentes à cefalotina e Miranda e Castillo (1998) que observaram 100% das estirpes de *A. sobria* sensíveis à amicacina, 81,82% ao cloranfenicol e à tetraciclina e 90,91% à gentamicina.

A resistências a múltiplos princípios activos, observada nos dados da Tabela 3 é semelhante a encontrado por Hassani *et al.* (1992) que verificaram resistência a dois ou mais princípios activos em 77,0% das estirpes e a encontrada por Rossi Júnior *et al.* (2000) que detectaram 84,3% de resistência múltipla a dois ou mais princípios.

Os isolados de *Aeromonas hydrophila* (Tabela 3) submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos apresentaram resultados semelhantes aos encontrados por Barnhart e Pancorbo (1992) os quais encontraram que 46,0% das estirpes de *A. hydrophila* foram resistentes a vários princípios e aos de Rossi Júnior *et al.* (2000), que evidenciaram 22,2% das estirpes de *A. hydrophila* resistentes a dois princípios e 38,9% a até seis princípios.

Quanto as estirpes de *A. caviae* (Tabela 3) os resultados encontrados podem ser comparados aos de Nociti *et al.* (1999) que ao testarem 24 estirpes de *A. caviae* isoladas de carcaças e cortes de frangos frente a 12 antimicrobianos observaram que 8,3% foram resistentes a mais de dois princípios e 29,3% foram resistentes a todos os antimicrobianos testados; já Rossi Júnior *et al.* (2000) verificaram que 89,2% das estirpes dessa espécie foram resistentes a dois ou mais princípios, sendo que houve estirpe resistente a nove e até onze dos doze antimicrobianos testados. Apesar da espécie *A. caviae* ser considerada como a de menor patogenicidade, quando comparada à *A. hydrophila*, a presença de estirpes dessa espécie, resistentes a um amplo espectro de antimicrobianos, deve ser motivo de preocupação.

O comportamento apresentado pelas estirpes de *A. sobria* (Tabela 3) difere do encontrado por Singh e Sanyal (1992) em que apenas uma porcentagem pequena de isolados dessa espécie foi resistente a múltiplos princípios activos.

O comportamento apresentado pelas estirpes das espécies *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. trota* e *A. schu-*

bertii é preocupante, uma vez que as estirpes dessas espécies foram isoladas na fonte de produção da carne de frangos e que o nível de contaminação do produto no comércio poderá elevar-se face às condições de armazenamento, o que poderá contribuir para o envolvimento dessas espécies em infecções e para a transferência extra-específica de fatores de resistência antimicrobiana. Os achados da pesquisa enfatizam que a utilização de antibióticos em avicultura deve obedecer às regras de “uso prudente” dos antibióticos, de modo a atenuar os impactos negativos sobre a eficácia dessas drogas em posteriores utilizações na medicina humana.

Bibliografia

- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. of Clin. Pathol.*, 45, 493-496.
- Barnhart, H.M. e Pancorbo, O.C. (1992). Citotoxicity and antibiotic resistance profiles of *Aeromonas hydrophila* isolates from a broiler processing operation. *J. Food. Prot.*, 55, 108-112.
- Freitas, A. C., Milhomem, A. M., Nunes, M.P., Ricciardi, I.D. (1993). Virulence factors produced by *Aeromonas hydrophila* strains isolated from different sources. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 24, 168-174.
- Gray, S.J. (1984). *Aeromonas hydrophila* in livestock: incidence, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility. *J. Hyg. Cambridge*, 92, 365-375.
- Hassani, L., Imzilm, B., Boussaid, A., Gauthier, M.J. (1992). Seasonal incidence of and antibiotic resistance among *Aeromonas* species isolated from domestic wastewater before and after treatment in stabilization ponds. *Microbiol. Ecology*, 23, 227-237.
- Jindal, N., Garg, S.R., Kumar, A. (1993). Comparison of *Aeromonas* spp. from human, livestock and poultry faeces. *Israel J. Vet. Med.*, 48, 80-83.
- Ko, W.C. e Chuang, Y.C. (1995). *Aeromonas* bacteremia: Review of 59 episodes. *Clin. Infect. Dis.*, 20, 1298-1304.
- Majeed, K.N., Egan, A.F., Mac Rae, I. (1989). Enterotoxigenic aeromonads on retail lamb meat and offal. *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 165-170.
- Miranda, C.D. e Castillo, G. (1998). Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. *The Sci. of the Total Environ.*, 224, 167-176.
- Nociti, D.L.P., Rossi Júnior, O.D., Amaral, L.A., Nader Filho, A. (1999). Bactérias do gênero *Aeromonas* em carcaças e cortes comerciais de frangos comercializados em Jaboticabal, Estado de São Paulo e comportamento das estirpes frente a ação de antimicrobianos. *Rev. Brasileira Ciência Vet.*, Niterói, 6, .69-73.
- Obi, C.L., Coker, A.O., Epoke, J., Ndip, R. (1995). *Aeromonas* and *Plesiomonas* species as bacterial agents of diarrhea in urban and rural areas of Nigeira: antibiogram of isolates. *Central African J. of Med.*, 41, 397-403.
- Rall, V.L.M., Iaria, S.T., Heidtmann, S., Pimenta, F.C., Gamba, R.C., Pedroso, D.M.M. (1998). *Aeromonas* species isolated from pintado fish (*Pseudoplatysma* sp): virulence factors and drug susceptibility. *Rev. Microbiol.*, 29, 222-227.
- Rossi Júnior, O. D., Amaral, L.A., Nader Filho, A., Rezende, N.C.M. (2000). Comportamento frente à ação de antimicrobianos em estirpes de *Aeromonas* sp. Isoladas em matadouro bovino localizado no estado de São Paulo, Brasil. *Ars Veterinária*, Jaboticabal, 16, 33-38.
- Singh, D.V. e Sanyal, S.C. (1992). Enterotoxicity of clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *J. Med. Microbiol.*, 36, 269-272.
- Singh, D.V. e Sanyal, S.C. (1994). Antibiotic resistance in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *J. of Antimicrobial Chemoth.*, 33, 368-369.

Cartas ao editor

Direitos dos animais – uma questão jurídica?

A questão dos direitos dos animais tem sido debatida, desde há muito tempo, por entidades de carácter activista e organizações não-governamentais que se dedicam à protecção da natureza e dos animais. Trata-se de uma filosofia que assenta principalmente em preocupações de ordem ética e moral. No entanto, os recentes avanços na ciência do bem-estar animal, em especial no que respeita a estudos de capacidades cognitivas, têm levantado questões relativamente à protecção jurídica dedicada aos animais não humanos. Serão os animais não-humanos susceptíveis de ser considerados num estatuto jurídico que lhes garanta protecção contra o sofrimento? Será legítimo considerá-los seres vivos, sencientes, e não apenas bens materiais? Para os que se interessam ou diariamente trabalham com animais, estas são questões possíveis e pertinentes, e foi no sentido do seu esclarecimento que assisti nos passados dias 13 /14 de Maio a um colóquio sobre o *status* moral e jurídico dos animais não-humanos, na Faculdade de Direito da Universidade de Lisboa.

A corrente legislação Portuguesa respeitante aos animais não-humanos, não os considera como sujeitos jurídicos passíveis de possuir direitos, assentando a sua protecção na lei nº 92/95 de 12 de Setembro, conhecida como “Lei de Protecção aos Animais”. Esta lei visa proibir “todas as violências injustificadas contra animais” bem como regulamentar a utilização e comércio dos mesmos, e ainda evitar o seu abandono. No entanto, e como se lê no artigo 9º da referida: “As sanções por infracção à presente lei serão objecto de lei especial”. Uma vez que não existem correntemente leis destinadas a suportar este artigo, fica impossibilitada a punição de quem infrinja a 92/95, não sendo, portanto, eficiente a protecção conferida desta forma aos animais não-humanos.

Para Jorge Bacelar Gouveia, advogado, Professor na Faculdade de Direito da Universidade Nova de Lisboa, seria legítima a criação de um ramo autónomo do direito, que se dedicasse aos animais não-humanos, como acontece no caso do Direito do Ambiente em relação à protecção da natureza. A questão dos direitos dos animais seria uma questão de ordem técnica, considerando a atribuição de alguns direitos aos animais, perante circunstâncias que se pudessem considerar como um prolongamento de características humanas, como o é o caso do sofrimento. Também Fernando Borges Araújo, advogado, Professor na Faculdade de Direito da Universidade de Lisboa, considera pertinente a atribuição de um estatuto especial aos animais. Na legislação Portuguesa considera-se poder ter direitos “quem possa reciprocá-los”; no entanto, existem situações como a infância, a demência ou estados de inconsciência prolongada em que o ser humano, não

tendo a capacidade de reciprocá-los, mais necessita que lhe seja conferida protecção jurídica. Para além disso, sendo a capacidade de sofrer comum a todos os seres humanos, não será também o que nos aproxima dos outros animais?

Hoje em dia, são cada vez mais os estudos científicos que sugerem a presença de mentes qualitativamente semelhantes à mente humana, em algumas espécies de animais, como os grandes símios (*e.g.* chimpanzés) e alguns cetáceos (*e.g.* golfinhos). Aos mamíferos em geral, reconhece-se a expressão de necessidades conscientes e aos vertebrados a presença de todas as estruturas necessárias para a percepção da dor. Nesse sentido, seria legítimo atribuir direitos a todos os animais que se saiba passarem o patamar cognitivo, e aos outros, apenas sencientes, proteger do sofrimento. É esta a proposta de Humberto Rosa, Professor na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, que sugere ainda que “os direitos dos animais não devem ser considerados por via da reciprocidade, mas por via dos seus interesses”.

Uma das medidas prioritárias, visando a protecção animal, seria dar ênfase à aplicação eficiente da legislação em vigor, bem como à verificação das cinco liberdades promovidas pelo Farm Animal Welfare Council (liberdade de fome e de sede, liberdade de desconforto, liberdade de dor, ferimentos e doenças, liberdade para expressar os comportamentos naturais, liberdade de medo e de stress) medida que “evitaria a maioria das implicações morais com que nos deparamos” – assim refere Ilda Gomes Rosa, Professora de Comportamento Animal na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. Outra medida, proposta por Pedro Galvão, Director do Centro de Ética Aplicada da Sociedade Portuguesa de Filosofia assentaria na atribuição aos animais não-humanos de um estatuto moral, que não implicando necessariamente que lhes fossem atribuídos direitos, viria antes salientar os nossos deveres morais para com eles.

Para que se compreenda a importância implícita nestas questões, Pedro Paulo de Azeredo Perdigão expôs algumas situações em que a invocação da legislação vigente foi efectuada com sucesso, como no caso recente do tiro aos pombos ou no indeferimento de um espectáculo de touros de fogo em Santarém, e de outros em que as óbvias limitações levaram ao insucesso, como no conhecido caso de Barrancos. Por sua vez, António Maria Pereira, advogado, sendo responsável pela criação da lei 92/95, expôs as limitações na sua concepção, como a sua redução a “lei-quadro” – o que implica que os princípios nela estabelecidos sejam remetidos para outras leis, neste momento ainda inexistentes. Explicou também as alterações a que deveria ser sujeita, no sentido de uma utilização eficiente, e que passariam pela sua regulamentação, de

modo a poder considerar directamente a aplicação de sanções. A aplicabilidade das directivas europeias respeitantes ao bem-estar e protecção animal, foi posteriormente discutida por Maria Luísa Duarte, Professora na Faculdade de Direito da Universidade de Lisboa.

Para melhor compreender o enquadramento legal da protecção animal no nosso país, exposições houve ainda por parte de Armando Louzã, Professor da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa e Carlota Pizarro de Almeida, Assistente na Faculdade de Direito da Universidade de Lisboa, referentes não só à posse e uso de animais, como também ao Direito Penal.

A última, mas não menos interessante intervenção, foi da responsabilidade de Manuel Eduardo dos Santos, Professor da Unidade de Eco-Etologia no Instituto Superior de Psicologia Aplicada, que nos elucidou acerca de três modos de olhar os animais não-humanos – como meros objectos (a visão correntemente expressa no nosso Direito), como recursos naturais a proteger e preservar para as gerações vindouras ou, numa perspectiva mais próxima do estatuto de pessoa jurídica, implicando portanto a atribuição de direitos.

Nesta iniciativa da Associação ANIMAL, e da CEDA (Centro de Ética e Direito dos Animais), para além dos esclarecimentos prestados relativamente a um assunto que nos merece a melhor atenção, testemunhei a vontade e interesse em melhorar a protecção legal dos animais no nosso país, por parte de pessoas ligadas não só à Ciência mas também ao Direito. A suportar este interesse, firmaram-se compromissos, por parte de Luíz Frasão Gomes – Secretário de Estado Adjunto e das Pescas e Assunção Esteves – Presidente da Comissão de Assuntos Constitucionais da Assembleia da República, visando estabelecer melhorias a nível da legislação em vigor, bem como no controlo da sua aplicação.

No contexto dos assuntos debatidos neste colóquio, foi ainda anunciado o lançamento do livro “A Hora dos Direitos dos Animais”, por Fernando Borges Araújo. Este livro, que vem abordar o assunto dos direitos dos animais de uma perspectiva jurídica e para lá das filosofias activistas, é a primeira obra dedicada ao assunto publicada por um autor Português.

Joana Marques
Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Porto
jmarques@ibmc.up.pt

Transporte de animais vivos: um problema.

A produção de alimentos de origem animal tem uma grande importância veterinária, sobretudo pela necessidade de assegurar uma baixa incidência de doenças nos animais e a qualidade sanitária dos produtos alimentares. Nos sistemas intensivos esta preocupação tem-se estendido cada vez mais ao bem-estar animal, entendido não só enquanto estado de saúde, mas também de conforto psicológico e social. O estudo do bem-estar animal tem incidido em explorações pecuárias, onde existem inúmeros factores de redução da

qualidade de vida dos animais e, mais recentemente, no abate e no transporte de animais.

O transporte de animais vivos tem-se revelado uma das áreas onde o sofrimento dos animais é mais evidente, tal como tem sido documentado por entidades oficiais e organizações não governamentais^{2,4,6,7} e corroborado por diversos estudos científicos. Da fome e sede, ao desconforto físico, medo e ansiedade, da quase total restrição comportamental, ao aparecimento de lesões e ferimentos, esta actividade perpassa todas as frentes ameaçadoras do bem-estar dos animais.

A protecção legal de que os animais vivos em transporte dispõem não tem sido eficaz, nem mesmo após a última revisão legislativa (directiva 95/29/EEC, transposta pelo decreto-lei 294/98)^{2,4,6}. Esta legislação estabelece um período máximo de trânsito de 8 horas em veículos normais, alargável para veículos especiais (conforme o regulamento 411/98). Também define períodos-limite de trânsito segundo as espécies e intervalos para alimentação, abeberamento e descanso. As viagens de longo curso implicam ainda paragens e descarregamento temporário de animais em locais especialmente preparados para o efeito (conforme o regulamento 1255/97). Algumas das limitações à aplicação da legislação em vigor são devidas ao sistema de fiscalização: entre 1997 e 2000 a Comissão Europeia (CE) efectuou 9 missões (duas das quais a Portugal), a apenas 8 países da UE. Quanto à maioria das infracções, mesmo quando detectadas, são raramente punidas^{2,4,6}.

Assim, os animais continuam a ser transportados por tempo excessivo, a longas distâncias, em veículos inadequados, sem água nem comida, por vezes durante mais de 57 horas, sem períodos de descanso compatíveis. Este facto não só afecta negativamente o bem-estar por fome e sede, como pode implicar sintomas de desidratação e cansaço, por vezes extremos. Embora um período de jejum anterior ao transporte possa ser importante para prevenir o enjoo e vómitos, sobretudo em porcos, na prática verificam-se nestes animais casos de jejum que se podem prolongar por mais de 30 horas antes do abate⁸. O gado bovino pode exibir sintomas de desidratação e cansaço após 15 horas de transporte, os quais podem prevalecer durante 5 dias⁹.

Os animais continuam a ser tratados com negligência, violência e incompetência durante o carregamento e descarregamento. Estes procedimentos são dos mais importantes factores de mal-estar no transporte, sendo não só causa de desconforto, mas também de dor, lesões, medo e perturbação. Para isso concorre o exercício forçado, a má concepção das rampas, o movimento em direcção a uma zona escura e o manéio usando objectos e procedimentos inadequados⁷. O carregamento mostrou ser a fase do transporte em que o ritmo cardíaco atinge o seu pico em porcos⁸, o mesmo sucedendo com o ritmo respiratório e a temperatura corporal em bovinos¹. Há animais transportados doentes ou feridos, em camiões superlotados, sujeitos a uma má condução. A sobrelotação é uma das mais vulgares

causas de agravamento do estado físico e psicológico dos animais, mesmo quando completamente saudáveis. Hematomas, lesões cutâneas e fracturas ósseas são os indicadores mais directos do seu efeito. Estes sintomas podem também ocorrer como resultado de ansiedade ou agressões causadas pela mistura de indivíduos ou de grupos sociais desconhecidos entre si¹.

Os animais continuam a não ser alvo das inspecções necessárias durante o trânsito, em que o descontrolo da temperatura, humidade e ventilação causam grave desconforto físico. Temperaturas excessivas têm mesmo sido apontadas como o principal factor de morte de aves em trânsito¹⁰, afectando de igual modo porcos⁸. Apesar de as ovelhas regularem eficazmente o calor através de uma respiração curta e rápida, são sujeitas a sintomas progressivos de desidratação que podem permanecer durante muitas horas, ou mesmo dias, após o transporte¹⁰. Outros aspectos geradores de desconforto, medo e perturbação são o barulho, as vibrações e a má condução do veículo em porcos⁸ e, em maior ou menor extensão, também nos demais animais.

Naturalmente que os “comportamentos normais” também são afectados. Inúmeros comportamentos básicos, como sentar ou deitar, esticar os membros, lambem o corpo, etc., estão muito limitados ou são mesmo impossibilitados por falta de espaço, mas também por ansiedade e medo. É comum os bovinos e ovinos não se deitarem durante viagens de 15 horas, enquanto que os porcos exibem frequentes mudanças posturais, saltos e vocalizações durante o trânsito¹⁰.

Os problemas de bem-estar apontados não são só revelados pelo comportamento ou por indicadores fisiológicos. Em função das alterações químicas atribuíveis ao *stress* e à fadiga, o peso da carcaça e a própria qualidade da carne podem ser afectadas, o mesmo se aplicando à resistência imunológica¹. Aliás, o problema do transporte de animais vivos não se restringe ao bem-estar. Quer a Federação de Veterinários Europeus⁵, quer a CE⁷ referem o potencial perigo de transmissão de agentes patogénicos por imunodepressão causada pelas condições do transporte, e ao risco da sua dispersão a longas distâncias. Algumas das doenças potencialmente transmissíveis desta forma incluem a febre aftosa, a peste suína clássica, a diarreia viral bovina, a gripe aviária e a doença de Newcastle.

A situação actual é reveladora de que a protecção dos animais durante o transporte não tem tido sucesso, apesar das alterações legais dos últimos 10 anos. Não é só por falta de fiscalização – são os próprios critérios legais em vigor que são de muito difícil e dispendiosa aplicação. A forma mais simples de reduzir o problema parece ser aquela que defende a Federação de Veterinários da Europa⁵: o abate deve ser tão próximo do local de produção quanto possível, e o comércio a longa distância deve ser substituído pelo comércio das carcaças.

Neste panorama, urge alterar a legislação com o objectivo de maximizar a sua aplicação e fiscalização. A CE está prestes a divulgar a sua proposta de legis-

lação, e espera-se que os governos nacionais estejam suficientemente alertados para poderem tomar as decisões mais consonantes com uma verdadeira protecção dos animais. Num contexto em que as questões éticas relacionadas com os animais e com a segurança alimentar assumem cada vez mais relevo, é inaceitável manter este grau de sofrimento e de risco acrescido para a saúde de animais e consumidores. Segundo o Eurogroup for Animal Welfare (EAW)³, uma das principais medidas a adoptar, sem consequências financeiras de vulto, seria a redução do período de trânsito para 8 horas. À perturbação do carregamento segue-se, sob boas condições de condução, um período de estabilização⁷. Contudo os sintomas de sede, fome e cansaço podem sobrevir por volta das 8 horas e tornam-se um problema crescente daí em diante. Como uma distância correspondente a 8 horas (cerca de 500 Km) permite, na maioria dos casos, a escolha de um matadouro e coincide com o período de descanso do condutor³, torna-se evidente a adequação desta medida. Uma vantagem adicional é o facto de os pontos de paragem se tornarem desnecessários, reduzindo assim a perturbação do descarregamento e carregamento e o risco de contaminação por agentes patogénicos. Nos casos especiais de necessidade de transportar animais destinados a reprodução por um período superior a 8 horas, essa deslocação deveria ser levada a cabo em veículos especiais e, tanto quanto possível, substituído pelo transporte de sémen e embriões⁵.

Outros aspectos relevantes a ter em conta passam pelo melhoramento das condições dos veículos e equipamento (estrutura das rampas, lotação e altura dos andares nos veículos, material de cama, etc.). Também a formação e certificação profissional dos transportadores e demais técnicos é de preponderante importância, assim como o melhoramento dos mecanismos de controlo e fiscalização.

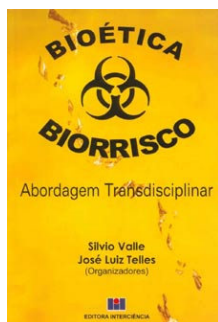
Uma proposta da CE para a revisão da legislação está em vias de ser discutida e analisada pelos Estados Membros. O EAW lançou uma campanha pan-europeia que visa os objectivos acima descritos, e em relação à qual quer a Ordem quer o Sindicato dos Médicos-Veterinários já manifestou partilhar as mesmas preocupações. Também a Direcção Geral de Veterinária afirmou estar a desenvolver diferentes estratégias para uma melhor aplicação da legislação. Portugal, como membro da UE, é um dos países visados pela campanha do EAW. Entre nós, embora o transporte rodoviário superior a 8 horas seja praticamente inexistente, as condições em que é feito viola muitos dos critérios de bem-estar⁶. Por isso, e por termos uma quota parte de responsabilidade política pelo transporte efectuado em qualquer ponto da UE, este assunto reveste-se de grande importância técnica, política e social. Esperemos que os profissionais e os decisores responsáveis pela produção animal tenham visão e vontade para reduzir o problema, com óbvios benefícios para o bem-estar animal e para a saúde pública.

Referências:

- ¹ Broom, D.M. e Johnson, K.G. (1993). *Stress and Animal Welfare*. Chapman & Hall (London).
- ² Eurogroup for Animal Welfare (1999). *Summary of Suffering I. Compilation of investigations*. (Brussels).
- ³ Eurogroup for Animal Welfare (2002). *The welfare of transported animals*. July (Brussels).
- ⁴ Eurogroup for Animal Welfare (2003). *Summary of Suffering II. Compilation of investigations*. (Brussels).
- ⁵ Federation of Veterinarians of Europe (2001). *Transport of live animals – FVE position paper*. Final version, 18 May.
- ⁶ Food and Veterinarian Office (2001). *Report of a mission carried out in Portugal from 14 May to 21 May 2001 concerning animal welfare during transport and certain aspects of welfare at the time of slaughter*. Final version 7 September. European Commission.
- ⁷ Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare (2002). *The welfare of animals during transport (details for horses, pigs, sheep and cattle)*. Report adopted on 11 March. European Commission.
- ⁸ Warriss, P.D. (1998). *The welfare of slaughter pigs during transport*. *Animal Welfare*, 7, 365-381.
- ⁹ Warriss, P.D., Brown, S.N., Knowles, T.G., Kestin, S.C. Edwards, J.E., Dolan, S.K. e Phillips, A.J. (1995). *Effects on cattle of transport by road for up to 15 hours*. *Veterinary Record*, 136, 319-323.
- ¹⁰ Webster, J. (1994). *Animal Welfare, a cool eye towards Eden*. Blackwell Science (Oxford).

Leonor Galhardo
Eurogroup for Animal Welfare
leonor.galhardo@mail.telepac.pt

Notas sobre publicações



Bioética & Biorrisco – Abordagem Transdisciplinar

Publicado pela Editora Interciência em 2003 no Rio de Janeiro, chegou-nos para apreciação a obra “Bioética & Biorrisco – Abordagem Transdisciplinar” organizada por Silvio Valle e José Luiz Telles (ISBN: 85-7193-075-9).

Os autores são investigadores da Fundação Oswaldo Cruz, onde há muitos anos se dedicam ao ensino e investigação. Juntando 28 colaboradores brasileiros, produziram esta obra original que aborda um conjunto de temas de extrema actualidade, integrando áreas desde as plantas e alimentos transgênicos, clonagem, bioética, contenção biológica, resíduos e segurança química, biotérios e biorrisco, e tendo como público alvo preferencial agrónomos, biólogos, biotecnologistas, bioteristas, químicos, farmacêuticos, médicos, veterinários e gestores na área da biotecnologia.

A obra em formato A5, tem 417 páginas e está dividida em duas partes. A primeira dedicada à clonagem e organismos geneticamente modificados (OGM) e a segunda ao biorrisco e segurança. Em cada uma delas, os capítulos constituintes têm uma lista bibliográfica actualizada, incluindo diversas referências a sítios na internet, permitindo ao leitor aprofundar e completar a sua pesquisa.

No prefácio da autoria de Spartaco Astolfi Filho (Universidade Federal do Amazonas), é referido que a génese desta obra resultou da necessidade de implementar um curso de biossegurança e ética biotecnológica na Universidade Federal do Amazonas. Tratando-se de matérias muito diversificadas, e em constante transformação, os autores quiseram transbordar o seu âmbito, dando corpo a esta obra. Para além dos estudantes de graduação e pós-graduação, pretendeu-se que este livro estivesse acessível a todos os profissionais que actuam na área, incluindo os responsáveis pelas políticas públicas, empresários e gestores.

Numa análise mais pormenorizada, a primeira parte é composta por oito capítulos dedicados aos aspectos da manipulação genética:

Desenvolvimento de plantas transgênicas (Patrícia Melo dos Santos e Manoel Teixeira Souza Jr) – neste capítulo, os autores fazem uma abordagem do desenvolvimento da engenharia genética a nível internacional e no Brasil. Os aspectos económicos são analisados nas perspectivas dos consumidores e empresariais. É conferida uma ênfase especial à resistência aos antibióticos

e sua aplicação no desenvolvimento de plantas transgênicas, bem como ao uso de antibióticos em medicina humana e veterinária. Este capítulo termina com uma nota dirigida às empresas públicas e privadas: “a última instância não é o Supremo Tribunal de Justiça nem a Academia Brasileira de Ciências, mas o bolso e a boca dos consumidores”.

O admirável mundo novo da clonagem (Lygia V. Pereira) – Após uma abordagem histórica, a autora analisa os aspectos da clonagem reprodutiva humana e da clonagem terapêutica humana, terminando com uma análise dos aspectos polémicos. Conclui que devemos evitar a proibição cega, e utilizar de forma responsável os poderes da clonagem, para fins exclusivamente terapêuticos.

Transgênicos: a difícil relação entre a ciência, a sociedade e o mercado (Rafaela Guerrante, Adelaide Antunes e Nei Pereira Jr) – os autores iniciam este capítulo abordando a problemática do OGM e organismo transgênico – “As diferenças: uma questão de semântica?” Segue-se uma avaliação da aplicação dos OGM a nível vegetal, animal e bacteriano, e dos potenciais riscos e benefícios. Concluem que neste triângulo a bioética é o pilar fundamental na sustentação dos argumentos pró e contra esta tecnologia, e que a bioética deve legitimar, perante a sociedade, os objectivos pragmáticos e a biossegurança.

Manipulação de plantas transgênicas em contenção (Rubens Nodari, Miguel Guerra e Silvio Valle) – neste capítulo é feita uma análise comparativa da manipulação genética e dos métodos tradicionais de melhoramento genético, tendo em atenção os possíveis riscos decorrentes desta tecnologia. A imprevisibilidade da tecnologia e a precaução como princípio orientador da investigação são outros dos aspectos abordados. Os autores concluem chamando a atenção para os danos ambientais e de saúde resultantes da introdução precipitada de tecnologias.

Avaliação de segurança dos alimentos geneticamente modificados (Edson Watanabe, Marília Nutti, Beni Olej e Luiz Caldas) – a avaliação da segurança de alimentos geneticamente modificados (AGM) feita a partir da sua equivalência substancial (ES) é analisada tendo em atenção o novo ADN, incluindo o produto da expressão de proteínas, potenciais efeitos secundários, potenciais de ingestão e impacto da introdução de AGM na dieta. Em conclusão, os autores referem os processos de avaliação internacionais prévios ao seu cultivo ou comercialização, e da necessidade do seu controlo e fiscalização.

Avaliação de riscos dos transgênicos orientada pelo princípio da precaução (Carlos Freitas) – após uma nota histórica do conceito de risco, o autor analisa a avaliação de risco como instrumento na tomada de decisões, incluindo uma abordagem da incerteza e vulnerabilidade neste procedimento. O autor termina fazendo uma análise da aplicação do princípio da precaução na avaliação do risco em processos de alimentos transgênicos.

Biossegurança e ética em saúde colectiva (Luis Cas-

tiel) – após uma história de bioterrorismo num futuro próximo, o autor analisa os aspectos da bio-insegurança interna e externa. É analisado em pormenor o impacto do jornalismo científico, incluindo as suas estratégias persuasivas e os apelos populares, na comunicação pública de conteúdos sobre biotecnologia, saúde e risco. Como considerações finais, o autor aborda a inadequação da bioética tradicional à Saúde Pública.

Bioética, Biotecnologias e Biossegurança: desafios para o século XXI (José Luiz Telles) – no último capítulo da 1ª parte, o autor antecipa alguns cenários “hipotéticos, porém factíveis” para o novo século, seguindo-se uma abordagem de considerações preliminares de biotecnologia e engenharia genética. O autor conclui referindo que “as respostas éticas às consequências das biotecnologias não estão dadas” e que esta problemática deve passar por um amplo processo de debate público, plural e democrático, introduzindo cinco questões de especial relevância.

A segunda parte da obra é composta por 11 capítulos, dedicados a aspectos técnico-científicos específicos, que embora diferentes estão interligados no objectivo da obra – uma abordagem transdisciplinar e multidisciplinar do biorrisco.

Riscos biológicos em laboratórios (Pedro Teixeira e Silvio Valle) – neste capítulo, parte do Curso de Biossegurança on-line da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, desenvolvem-se noções básicas da aplicação do risco biológico para profissionais de laboratório, nomeadamente questões de sinalética, barreiras primárias, equipamentos de protecção individual e colectiva, células de biossegurança e outros procedimentos fundamentais.

Dimensões psicossociais do acidente com material biológico (Paulo Brandão Jr) – o variado conjunto de riscos biológicos, químicos, físicos, ergonómicos e psicossociais a que estão expostos todos aqueles que trabalham em ambiente hospitalar é aqui analisado, numa perspectiva de contextualização, causalidade e acções a desenvolver.

Bioinstalações (Cristina Pessoa e Renata Lapa) – vocacionado para os aspectos de biossegurança em instalações laboratoriais, são aqui analisados aspectos importantes no contexto dos projectos de engenharia. É feita uma abordagem dos requisitos recomendados e obrigatórios de acordo com os diferentes níveis de segurança, incluindo especificações técnicas dos materiais de construção.

Prevenção e combate a incêndios em laboratórios (Fernando Costa) – A prevenção de sinistros em áreas laboratoriais e afins é de primordial importância, bem como o conhecimento das acções a desenvolver perante este tipo de situações. Os aspectos preventivos e de protecção no combate a incêndios, métodos de extinção e os riscos estruturais nas edificações sinistradas são abordados em detalhe. O capítulo termina com questões de primeiros socorros, com especial ênfase para as queimaduras.

Cabines de segurança biológica (Adriano Campos) –

este capítulo é dedicado a este tipo de barreira primária, analisando-se os aspectos da sua construção, instalação, funcionamento e certificação.

Limpeza, desinfecção e esterilização (Ieda Nogueira) – com base nas propostas do CDC (USA), são analisadas em pormenor as medidas de precaução básicas e específicas, nomeadamente o processamento de artigos e superfícies, a padronização de métodos e a sua validação.

Biossegurança em biotérios de experimentação (Joel Majerowicz) – os riscos específicos dos diferentes tipos de biotérios são analisados numa perspectiva química, física e biológica. Os riscos biológicos merecem um especial detalhe, pela sua importância na transmissibilidade entre animais e ao homem. Salienta-se a prevenção da introdução de agentes patogénicos, classes de risco, orientações, equipamentos de segurança, edificação e eliminação de resíduos em biotérios.

Considerações sobre o bem-estar animal (Nicolau Serra-Freire) – este capítulo aborda a problemática do Bem-Estar Animal, em perspectivas sociais, filosóficas, religiosas e jurídicas. O autor apresenta-nos um ponto de vista integrando diferentes abordagens, numa perspectiva muito actual desta questão, salientando a necessidade de “desenvolver a consciência de que esses direitos (Declaração Universal dos Direitos dos Animais) devem ser respeitados”.

Segurança química em laboratórios de biotecnologia (Paulo Carvalho) – após uma introdução criticando a precariedade de equipamentos de protecção individual (EPI) existentes nos laboratórios, o autor analisa os procedimentos para a prevenção de acidentes e as suas principais causas.

Resíduos sólidos em serviços de saúde (Paulo Rebello) – a definição de resíduo sólido e a legislação relacionada, introduzem este capítulo onde se abordam as questões da produção, classificação, manuseamento, tratamento e destino final de resíduos sólidos. Em conclusão, o autor salienta a necessidade de uma maior intervenção de toda a sociedade nesta questão.

Biossegurança nas Universidades (Maria Alice Amaral e Paulo Carvalho) – neste capítulo final reforça-se o papel que a Universidade e outras instituições de ensino têm na formação dos profissionais e de como o devem exercer.

Como nota final, é gratificante encontrarmos uma obra original escrita em português e tão actual sobre as questões do biorrisco e da bioética. Citando a apresentação de Eloi Garcia, da Academia Brasileira de Ciências, “o livro terá um grande impacto no debate sobre bioética, biorrisco e biossegurança nos próximos anos” e contribui para a compreensão das “vantagens, potenciais riscos, desafios e impactos sobre o bem-estar e a sobrevivência da espécie humana”. Compilando os pontos de vista de 28 autores com formações e experiências profissionais tão diversificadas, num conjunto de vinte artigos, é uma obra que definitivamente recomendo aos nossos leitores. Por mim, considero-a suficientemente importante para a indicar como bibliografia de consulta

imprescindível para os meus estudantes de graduação e pós-graduação.

Eduardo Marques Fontes, Prof Catedrático
Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa
Rua Prof. Cid dos Santos, 1300-477 Lisboa

Reuniões científicas e cursos, notícias

9th FECAVA Congress/12^o Congresso Nacional da APMVEAC

A Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialista em Animais de Companhia (APMVEAC) realizou nos passados dias 22 a 25 de Maio, conjuntamente, o 9^o Congresso da Federation of European Companion Animal Veterinary Associations (FECAVA) e o 12^o Congresso Nacional da APMVEAC. O Congresso decorreu no Centro de Congressos do Estoril, sob o alto patrocínio de S. Exa. o Presidente da República. O número de Congressistas ascendeu a 737, dos quais 146 eram estudantes de Medicina Veterinária. O encontro de Auxiliares de Consultório contou com 77 inscritos. De 33 nacionalidades presentes, as mais representadas, para além de Portugal, foram Espanha, França, Bélgica, Grécia e Reino Unido. No dia 22, dia Pré-Congresso, decorreram reuniões anuais da EAVE (European Association of Veterinary Editors) e do IEWG (International Elbow Working Group). Esta última foi aberta a não membros.

O programa científico foi elaborado de forma a cobrir as áreas mais importantes para a clínica diária de animais de companhia, tendo contado com a participação de 32 Oradores de renome mundial, em cada uma das áreas científicas escolhidas (Gastroenterologia, Ortopedia, Oncologia, Medicina, Cirurgia, Pneumologia, Endocrinologia, Imagiologia, Hematologia, Dermatologia, Oftalmologia, Doenças Hereditárias e Neurologia). Várias comunicações livres orais e em painel foram também apresentadas. Doze oradores nacionais foram convidados pela organização a proferir palestras de programa. Das quatro palestras "State of the Art" do programa, os Professores António Ferreira e Duarte Correia da FMV UTL apresentaram, respectivamente, a de Neurologia e a de Dermatologia. As doenças hereditárias tiveram um lugar de destaque no programa, e este Congresso será certamente o arranque para um projecto de controlo das doenças hereditárias, a nível europeu.

A APMVEAC tem realizado anualmente um curso para auxiliares de consultório a par do Congresso Nacional. Neste congresso, o programa para Auxiliares foi complementado com sessões práticas, para além das palestras teóricas.

Durante o Congresso, o qual foi patrocinado por 14 empresas de destaque na indústria farmacêutica, de alimentos para animais e de equipamento médico-

cirúrgico, esteve patente uma completa exposição comercial.

Reunião anual da European Association of Veterinary Editors (EAVE), Estoril, 22 de Maio de 2003

Teve lugar no dia 22 de Maio no Centro de Congressos do Estoril, dia pré-congresso FECAVA, a reunião anual da EAVE, organizada pela Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias e pela revista Veterinária Técnica, órgão do Sindicato dos Médicos Veterinários, e com o patrocínio da Merial Portuguesa. A Reunião contou com 20 participantes, representando 10 revistas da especialidade, designadamente: *Argos*, *European Journal of Companion Animal Practice*, *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *Le Monde Vétérinaire*, *Revista Portuguesa Ciências Veterinárias*, *The Veterinary Record*, *VDV Magazine*, *Veterinária Técnica*, *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* e *European Journal of Companion Animal Practice*. O programa do encontro incluiu para além da apresentação das revistas participantes e da reunião de trabalho sobre a associação, três palestras sobre assuntos centrais para a actividade editorial veterinária, cujos resumos se reproduzem abaixo. A reunião terminou com visitas guiadas ao Hospital Veterinário do Restelo e ao Oceanário de Lisboa, aos quais a organização reitera aqui o seu agradecimento.

The profiles of veterinary profession in Europe

Yolanda Vaz, Cristina Vilela

FMV - UTL, Rua Prof Cid dos Santos, 1300-477 Lisboa

The objective of the presentation was to characterise the target public of veterinary publications in the EU, namely veterinarians and veterinary students, with special emphasis on the countries present to the meeting. Some results of the EU Thematic Network Project Vet2020, regarding the distribution of the vet professional groups and the opinion of vets, employers and consumers about the future of the profession, were also presented.

The Vet2020 Project, where 13 EU and 7 non-EU countries participated, issued 2 publications: i) "Current Aspects of Veterinary Profession and Education in Europe", with a vet profession outlook (number of schools, students and vets, and their distribution according to fields of work, changes in numbers and gender over time and number of main livestock species); ii) "Prospects for veterinarian profiles: requirements by the profession and the society", with the results of 3 surveys: the Vet Survey (835 inquiries) (Practitioners, Public sector, Industry, Education & Research), and the Non-Vet Survey divided into: a survey of vet organisations and employers of vets (236 inquiries) (Food, Feed and Pharmaceutical industries, Administration, Unions, Associations, Councils) and a survey

of consumers organisations (111 inquiries) (Farmers, Breeders, Animal Welfare, Consumers, Environmental Protection).

According with data published by the OIE (Handistatus II), the number of vets per country in the European continent has a size group distribution that varies from less than 100 vets per country to more than 10 000. Austria, Greece and Portugal fall in the class 2 000 to 3 000 vets, Belgium has 5 000 to 10 000 vets and France, Spain and the UK more than 10 000 vets. The target public of veterinary publications is very much related with the language of publication. English, Spanish and French have a larger distribution around the world, Portuguese, with the Brazilian market and some African countries, have also some potential for expansion but Austrian and Greek is more limited. These 2 journals, however, are published in German and in English, which enlarges their target group.

In the EU, according with the data published by Vet2020, FVE and EAVE, the country with more veterinarians and vet students is Germany (36 823) and Finland has the smallest number (1 888). The numbers regarding the countries attending the meeting are: Spain 28 256, the UK 22 497, France 21 354, Belgium 9 224, Greece 6 486, Portugal 4 978 and Austria 4 750. However, when comparing the number of vets with the population, Belgium appears in the first place with 0.57 vets/10 000 inhabitants, Greece have 0.55, Austria 0.43, Portugal 0.32, France 0.31, Spain 0.26 and the UK 0.25 vets/10 000 inhabitants.

The "densities" of vet students in relation to the population, do not follow the same order, with the exception of Belgium that presented the highest number, 0.33 vet students/10 000 people. It was discussed that most vet students in Belgium are in fact French students that could not enrol in French faculties. Portugal, Spain and Austria presented 0.18, 0.17 and 0.16 vet students/10 000 inhabitants, respectively, while Greece, UK and France presented 0.06, 0.04 and 0.03 vet students/10 000 inhabitants, respectively.

Comparing the number of vet students with the veterinarians in each country, some thoughts on the renovation of the profession were presented. If a veterinarian works for 40 years (from 25 to 65 years old), the expected "annual replacement" would be $1/40=2.5\%$. All countries presented a rate vet students/vets over 10% which foresees an increasing of the profession. The number of new graduates per year per country varies from near 1 500 in Spain to around 50 in Finland.

The distribution of professional groups has the following general pattern: General Practice: 50.8%; Veterinary Public Health: 15.5%; Retired: 10.4%; Other: 8.3%; Industry: 5.5%; Education and research: 4.7%; Unemployed: 4.5% and Army: 0.3%. These proportions vary from country to country and this data is also influenced by the detail of information collected in each country. The proportions of general practitioners

vary from 78% in the UK to 43% in Greece and Spain. Veterinary Public Health professionals vary from 27% in Portugal to 6% in Greece. The proportion of retired vets is also very different from country to country and is influenced not only by the data registers but also by the age of complete retirement.

Regarding the future of the veterinary profession, results from the Vet2020 Project, where a sample of 835 vets participated (79.4% male, 18.7% female; 56.3% from private sector, 41.5% from public sector; irregular distribution per country), showed that in all 20 responding countries, more than 10% of vets think that the profession presents an increasing trend up to the year 2020. In two regions (Belgium, France, the Netherlands and Sweden, Norway, Finland) more than 50% of vets believe that the profession will grow and in the region "Portugal and Spain", the same opinion was only shared by 10.7% of vets. Livestock population, the traditional field of employment of veterinarians, remains stable or increasing, from 97 to 2001, for pigs, chicken and goats, in most countries, while cattle and sheep tend to decrease in most countries. In fact it is not animal breeding or herd health that are perceived to constitute promising fields of employment of vets in the future. These 2 areas along with animal experimentation are believed to be decreasing. Research & Development, sports animals, aquaculture and fish farming were pointed as areas with some stability and the fields regarded as future areas of employment are: food quality and safety, public health, environmental protection, organic farming, animal welfare, exotic animals clinics, pet/companion animals clinics, alternative medicine and epidemiology.

In relation to another important role of vet publications, the education and career development, Vet2020 interviews revealed that 61.0% of vets already have additional training (varying from 18.2% in Portugal and Spain to 72.1% in France, Belgium and the Netherlands). Areas to be developed in the future vet *curricula* are in accordance with those expected to be more important in the future: food quality and safety, public health, herd health, pets/companion animals clinics, environmental protection, epidemiology and animal welfare.

The usefulness of several professional training mechanisms was accessed and professional experience received 9 points (from a scale 0 to 10). Trade fairs received 5 points, post graduate education a little more and specialised journals appear with 6.5 points. Other items above specialised journal included continuing professional development, specialisation courses, Internet, basic qualification, internship, residencies, seminars and congresses, etc.

In conclusion, the target group of each journal very much depends on its language and its availability and distribution (EU, Europe, World), but also on their quality and their adaptation to a specific subject or professional group. A change of requirements for the

veterinary profession is under development (as well as the raising of new ones), like the increase of the field of companion animals practice, exotic animals, food safety and organic farming, which means a continuous adaptation of the contents of publications to the new needs.

The number of vet professionals is increasing as well as the need of CPD (continuous professional development) and LLL (long life learning) for career development. New means of communication like the use of on-line publications and the distance learning are also being expanded and becoming important issues. In the world of competition, the impact index condition “who publishes were” and is a key feature for the interest of the publications and the perception of the public of their social and scientific role.

**Oh no! Not another on-line publication.
Scientific e-publishing – The RPCV experience
Telmo Pina Nunes, RPCV
tnunes@fmv.utl.pt**

The Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias (RPCV) is a veterinary science journal and it's published since 1902. Its main goal is to promote veterinary science in Portuguese speaking countries. Its published quarterly and the 1300 copies are distributed to the members of the Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias and to Veterinary School Libraries.

In the last decade, new digital technologies and communication systems have changed the way people communicate. The communication of scientific ideas is no exception. The use of digital support media and the worldwide use of Internet have changed the way researchers communicate and discuss the outcome of their work. The scientific publication on the Internet – scientific e-publishing – can be an easier, faster and eventually less expensive way to make available to a broader range of researchers the contents of paper based scientific publications. Nevertheless, the decision to move to e-publishing, has to be made taking into consideration several factors: i) The cost-benefit factor – Although the publication process used for paper journals can be used to produce contents in digital media (e.g. Adobe Acrobat PDF files), the development of a World Wide Web homepage, Server hosting and increased personal costs have to be weighted with the potential benefits of reaching to a wider range of researchers. ii) The survival factor – As more journals move to e-publishing, researchers tend to change the way they access to scientific journals. Most researchers don't go to libraries to read research papers and use the internet to access journals. An exclusive paper based publication might have some problems in surviving in the future. So, taking this in consideration, the editorial staff of the RPCV has decided, in late 2001, that the on-line version was an priority to complement the printed version.

There are several technical solutions available to publish a scientific journal on-line. The choice has to be made considering the budget available for creation and maintenance of the e-journal and the changes in the traditional publishing process and workflow that some of these solutions require. Below are some of the technical solutions taken into consideration by the RPCV editorial staff: i) Use a specialized web platform for scientific journals (e.g. Highwire Press, <http://highwire.stanford.edu/>). This solution has several advantages. It was developed in 1995 and it has the experience of publishing more than 300 Journals, including some of the most highly cited Journals. It's a full-text publishing system with advanced search technology. It also provides an e-commerce solution with subscription control and a manuscript management and peer-review support system. The main disadvantage of this system is that it requires the use of SGML/XML technology in the publishing workflow. For small publishers the implementation of such a system would be too expensive to support. ii) Contract a webdesigner for a “taylor made” solution. This solution would allow the use of state of the art technology and technical support. Although, the specific needs of scientific publishing, the relative inexperience of local webdesigners in this area with a consequent long implementation period and implementation cost, were major constraints to this solution. iii) Make an “home-made” e-journal using available brainware and hardware. The major disadvantage of this solution was the limited technical knowledge of the RPCV editorial staff. This led to the use of static HTML pages. Static HTML limits the use of intuitive search facilities and increases the time spent in the setup of new editions. The advantage of this solution is undoubtedly the reduced cost to implement it.

Due to the reduced budget available to make an on-line presence, this last solution was the adopted by the RPCV editorial team to give the first steps in electronic publication. It makes no sense to have an on-line publication if people don't know its available. So, after publishing the first on-line issues, an effort was undertaken to get researchers to the webpage. This task is easier if a journal is indexed in the major scientific indexes like Medline. For example, the search engine of Pubmed allows publishers to provide links to each article in the database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/linkout/>), being that the most logical approach to refer people to an on-line journal.

If a journal is not indexed in Medline there are other options. One is to submit the site address to scientific web search engines like Scirus (<http://www.scirus.com>) or general search engines like Google (<http://www.google.com>), Yahoo (<http://www.yahoo.com>) or Altavista (<http://www.altavista.com>). Care must be taken in the coding of webpages, since most search engines will look for metadata. These are invisible strings in the HTML code like the title and keywords.

Most search engines will rate the relevance of webpages for a search based on this metadata. The effort put by RPCV in this work has been rewarding. As an example search strings like “canine dilated cardiomyopathy”, “puerperal endometritis” or “abomasal volvulus” list RPCV articles in the first five links in Google or Yahoo.

One other option is to submit the webpage address to medical publication indexes like FreeMedicalJournals (<http://www.freemedicaljournals.org>). This has brought a considerable number of readers to the RPCV site, but most of page hits were referred by general search engines.

The usage reports or weblogs generated by the server can be very useful. Not just hit counters but also to understand the reaction of the users to the webpage. By the user behaviour, one can understand what in the webpage can be improved.

Even with a simple approach to e-publishing, after one and a half year, to the RPCV editorial staff the results exceeded the expected ones. In this time period, there were about 50,000 unique visits to the site. Presently, the monthly visits rise to about 7,500, coming from 67 different countries. Taking into consideration that the printed version has 1300 copies, these results are quite rewarding.

Design Anatomy **Margarida Oliveira** **Forma Design**

1. Design: what is it? How does it work?

Design is, above all, solving problems, making sense and searching for new perspectives.

Designing a magazine is a combination of a Material structure – certain elements (typography, images and grid) and rules (information hierarchy, relationship between word and image, identity and consistency, composition, order, details) that create an ordered environment, an organized atmosphere, which enhances clearness and an Immaterial structure, which is related to the specificity of a certain project. What will define its identity, its uniqueness and also its coherence? The characteristics that will ultimately provide the soul to the project!

In design, however, all problems are different. And even if there are rules, there are no recipes. To serve a specific purpose, and to keep a creative approach that will capture reader’s attention, there must always be an interpretation. That’s the input of the Immaterial structure.

2. Design: what can I get from it?

Design is a balance between methodology and inspiration; research and intuition; exactness and sensitivity; function and aesthetics. Utility and beauty walk hand in hand in each design project.

There’s what I call Invisible design – which has to do with the structure behind what you look: the grid, typographical details, repeated colour schemes – that

grant the conditions of a quiet and productive reading, without effort.

And there’s Visible design – whose main purpose is to challenge the reader through details, illustrations, photography or other elements (like the quality of titles or summaries) – cause him to think beyond the obvious. It’s provocative, stimulating or mere fun.

3. Design: how shall I use it?

Always start with a concept. Deal with contents in a practical way using integrity, sensitive interpretation and – when possible – wit. Integrate beauty, in a simple way, as a result of a coherent structure or with the care for details.

Reuniões científicas e cursos, agenda

7th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction: A decorrer em Dublin, Irlanda, no Dept. of Animal Husbandry and Production, University College Dublin, de 4 a 6 de Setembro de 2003. O programa é bastante abrangente e inclui, entre outras, sessões sobre o desenvolvimento folicular, oócito/embrião e fetal em mamíferos; reprodução em vacas de grande produção leiteira; reprodução em suínos; reprodução em éguas; nutrição/reprodução; esperma; imunocastração de suínos; detecção de estro em bovinos; obstetrícia equina e bovina; genoma e reprodução; indicadores de fertilidade no macho; técnicas de reprodução assistida; o útero no periparto na égua; reprodução canina/furão; gestação e pós-parto. Serão também abordadas novas estratégias no ensino da reprodução em Medicina Veterinária. Informações: Dr. Mark Crowe, tel: +353 1 7166255, Fax: +353 1 7166253, e-mail: mcrowe@ucd.ie, website: www.tzv.fal.de/esdar

Vida associativa

Condecorações: Foi atribuída a Comenda de Mérito Agrário de Espanha aos colegas Dr. Luis Themudo e Melo e Dr. Gamboa da Costa Pela especial colaboração com os serviços técnicos da Direcção Geral de Ganaderias de Espanha. A imposição das comendas decorreu numa cerimónia em Madrid, no Ministério de Agricultura de Espanha no dia 14 de Maio de 2003. O Dr. Luis Themudo e Melo que desempenhou durante vários anos o cargo de Director dos Serviços de Controlos Veterinários foi também louvado pelos bons serviços prestados no desempenho das suas funções pelo Ministro de Agricultura e Pescas do governo português.

Obras na sede da SPCV: A sede da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, a antiga biblioteca da Escola Superior de Medicina Veterinária, está a sofrer obras de beneficiação. Pretende-se transformar aquele lindíssimo espaço num polo activo da vida da Socie-

dade e num ponto de encontro dos que se dedicam às ciências veterinárias.

Movimento de sócios: de 1 de Abril a 30 de Junho de 2003 foram admitidos ou readmitidos os sócios que a seguir se indicam. Sócios efectivos: 1148 Daniel Luís Patacho de Matos, 1788 Luís Miguel do Amaral Cruz, 2157 Bruno Alexandre Lopes Mendes, 2158 Luís Pedro de Lima Lobo, 2159 Sérgio Tomás Matos da Cunha. Sócios estudantes: 2161 Alexandra Fraústo da Costa, 2162 Sara Costa Barreto Leitão, 2163 Catarina Rombert Pinhão, 2164 Luís Manuel Correia Milho, 2165 Ana de Aboim Inglez Queimado, 2166 Gonçalo Manuel Antunes, 2167 Joana Isabel Alexandre Soeiro, 2168 Mónica Pereira Simões, 2169 José Luís de Almeida Campos, 2170 Pedro Bebiano Alenquer, 2171 Gonçalo d'Aguiar Lucena, 2172 Ana Patrícia Branco, 2173 Ana Carolina de Sousa Saramago, 2174 Mariela Luísa Cardoso Marques, 2175 Luísa Cardoso Alves, 2176 Dora Sofia Assis, 2177 Ana Catarina Mora Torres, 2178 Ana Sofia Barbosa, 2179 Ana Sofia da Conceição Mendes, 2180 Joana dos Santos Gon-

çalves, 2181 Joana Margarida Monteiro, 2182 Sónia Neves Ferreira da Silva, 2183 Valter Pereira Cabecinha, 2184 Ana Lemos Rodrigues Calvão, 2185 Andreia Viviana Craveiro, 2186 Tiago Corte-Real Bispo, 2187 Doroteia Isabel Filipe Bota, 2188 Vera Guilhermina Pereira, 2189 Lilianne Cunha Jorge, 2190 Margarida António Serra, 2191 Inês Martins de Almeida, 2192 Pedro Campos Godinho, 2193 Ana Valença, 2194 João Pedro Carvalho Piçarra, 2195 André dos Santos Costa Pereira, 2196 Simão Alves da Silva, 2197 Joana Filipa Encarnação Pereira, 2198 Marta de Araújo Barros, 2199 Joana Roque Bernardes, 2200 Vera Lúcia de Jesus Leiria, 2201 Frederico Gonçalves Eusébio, 2202 Carlota Graça Torres Guerreiro, 2203 Patrícia Isabel Ponte, 2204 Catarina Duarte Guerreiro, 2205 Virgínia Rico Pires, 2206 Fernando Vaz Dias, 2207 Carolina Mendonça Guardado.

Necrologia: Faleceu no dia 16 de Abril do corrente ano o colega Dr. Herlander Miguel da Silva Fazenda, sócio nº 777 da nossa Sociedade. À sua família as nossas sentidas condolências.

Informações aos autores

A Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias publica memórias científicas originais, revisões, ensaios e notas técnicas, considerados relevantes para as ciências veterinárias. Poderão ser ainda considerados para publicação relatórios de missões de estudo. Os artigos devem ser escritos em português ou inglês e enviados à Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias ou directamente ao editor da Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, acompanhados de uma carta a solicitar que o artigo seja considerado para publicação nesta revista. O signatário deve assegurar-se de que todos os autores concordam com essa submissão.

De cada artigo devem ser enviados um original impresso em papel branco de formato A4, só numa das faces, com margens largas e a dois espaços em toda a sua extensão, e uma disquete de computador contendo o ficheiro correspondente, rotulada com o nome do ficheiro e do processador de texto utilizado. Quando não for possível enviar o ficheiro devem ser enviadas, para além do original, duas cópias do trabalho. A formatação do texto deve ser reduzida ao mínimo indispensável. Deve usar-se tabulação no início de cada parágrafo mas deve evitar-se o uso de qualquer outro tipo de formatação do parágrafo como por exemplo marcas e números ("bullets and numbering"). Deve evitar-se também o uso de fontes em itálico ou a cheio ("bold") para chamar a atenção para esta ou aquela passagem do texto.

A primeira página deve conter o título do artigo em português e inglês, o nome dos autores, o nome das instituições onde o trabalho foi realizado e os seus endereços completos. Sempre que haja mais do que um autor, deve ser identificado o autor para quem a correspondência referente ao artigo deve ser endereçada com * a seguir ao nome, do qual se deve indicar o número de telefone e/ou fax e, se possível, o endereço de correio electrónico. Esta informação será impressa em nota de fim de página. Caso não seja indicado um autor para correspondência, será considerado como tal o signatário da carta de submissão do artigo e será omitida essa informação do artigo impresso na revista. Quando haja mais do que uma instituição devem ser utilizados os numerais 1, 2, 3, 4, etc., a seguir ao nome de cada autor para o fazer corresponder a cada uma das instituições listadas. Quaisquer outros símbolos poderão ser utilizados para incluir em nota de fim de página informação adicional, como por exemplo a morada institucional à data da publicação de um autor que já não desenvolve a sua actividade na instituição onde o trabalho foi realizado.

Seguem-se os resumos em português ("resumo") e inglês ("summary") que não devem exceder 200 palavras cada. Chama-se a atenção para o facto de os resumos terem uma vida independente do artigo, normalmente com uma difusão mais alargada e, portanto, deverem por si elucidar o leitor sobre enquadramento do estudo, metodologia utilizada, principais resultados e conclusões. As memórias científicas originais podem ser apresentadas como artigos em formato convencional, estruturados em "introdução", "material e métodos", "resultados", "discussão" e, opcionalmente, "agradecimentos". Alternativamente, as memórias científicas originais podem ser apresentadas sob a forma de comunicações breves e, neste caso, a divisão em secções é dispensável. Os outros tipos de artigo devem ser estruturados de acordo com a conveniência da exposição.

As abreviaturas devem ser apresentadas por extenso da primeira vez que aparecem no texto e apenas quando se tratar de abreviaturas que não sejam partilhadas pela generalidade da comunidade científica veterinária.

As referências bibliográficas no texto devem ser citadas indicando o nome do autor, sem iniciais, seguido do ano de publicação. Por exemplo: (Taylor, 1980) ou Taylor (1980). Se a publicação tiver dois autores devem indicar-se o nome dos dois autores. Por exemplo: (Taylor e Burns, 1974) ou Taylor e Burns (1974).

Se tiver mais de dois autores deve indicar-se o nome do primeiro autor seguido de et al. antes da indicação do ano de publicação. Por exemplo: (Taylor et al., 1981) ou Taylor et al. (1981).

Na secção "bibliografia" devem constar todos e apenas os trabalhos citados, listados por ordem alfabética onomástica. No caso de publicações periódicas devem indicar-se nome dos autores, ano de publicação, título completo do trabalho, nome da publicação em itálico, volume, primeira e última páginas. Por exemplo: Barata, G.N. e Calheiros, F.C. (1981). Eficiência na produção de carne ovina - estudo dos seus parâmetros genéticos. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 79, 91-108.

No caso se tratar de livros ou secções de livros devem indicar-se nome dos autores, ano de publicação, título do capítulo ou secção do livro se se aplicar, título do livro em itálico, nome dos editores, nº da edição se não for a primeira, editora, primeira e última páginas. Por exemplo:

Armitage, P. e Berry, G. (1987). Statistical methods in medical research. Blackwell Scientific Publications (Oxford).

O'Brien, M. e Gottlieb, L.S. (1979). The liver and biliary tract. In: Pathologic basis of disease, 2ª edição. Editores: S.L. Robbins e R.S. Cotran. W.B. Saunders company (Filadélfia, Londres, Toronto), 1009-1091.

Quando forem citados diversos trabalhos de um mesmo autor devem aparecer primeiro os trabalhos em que ele é o único autor, depois os trabalhos em que haja um segundo autor, listados por ordem alfabética deste segundo autor, e por fim os trabalhos em que haja mais co-autores. Dentro de cada um destes grupos os trabalhos devem ser ordenados cronologicamente e quando haja necessidade, a seguir ao ano de publicação indicar-se-á a, b, etc. (por exemplo: 1981a, 1981b, etc.)

Em todos os trabalhos, independentemente da matéria versada e da forma de apresentação, devem usar-se as grandezas e unidades do Sistema Internacional de Unidades (SI) e os prefixos SI para indicar os seus múltiplos e submúltiplos decimais. O sinal decimal deve ser a vírgula sobre a linha e apenas no resumo em inglês o ponto sobre a linha. Deve deixar-se um espaço entre o número e a unidade (por exemplo: 2,3 g e não 2,3g; 37 oC e não 37oC)

Não há limites rigorosos de tamanho para os artigos a publicar mas os textos devem ser concisos e como indicador estabeleceu-se como limite máximo 7000 palavras para os artigos de revisão, 5000 palavras para memórias científicas originais em formato convencional, 3000 palavras para as comunicações breves e 1500 palavras para as notas técnicas. O conjunto de figuras e tabelas não deve exceder 8 nas memórias científicas originais em formato convencional, 4 nas comunicações breves e 2 nas notas técnicas. Só quando o teor do artigo e a clareza da exposição manifestamente o exigirem se aceitarão manuscritos que excedam estes limites.

Os manuscritos submetidos são considerados confidenciais até à sua publicação. Todos os trabalhos são apreciados por dois revisores a quem a comissão editorial reconheça mérito na matéria versada, quer sejam ou não membros da comissão. Esta apreciação deverá ser efectuada no prazo de 3 a 4 semanas e os pareceres emitidos pelos revisores, juntamente com a informação da decisão do editor serão enviados ao autor correspondente dentro de 4 a 6 semanas.

Qualquer esclarecimento pode ser solicitado à Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, Edifício Escola Superior de Medicina Veterinária, Rua Gomes Freire 1169-014 LISBOA, Tel. 21 358 02 22, Fax 21 358 02 21, ou directamente ao editor da Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias (alexandre@fmv.utl.pt).