



Figura 3 - 5º dia de queda do hospedeiro

A- Órgão de Gené sob lupa. Glândulas craniais (GC) e glândulas caudais (GD) já desenvolvidas.

B- Glândulas (G) com numerosas peças tubulares longas e ramificadas. MEV.

C- Detalhe das células que compõem as glândulas. Substância amorfa (S). Azul de metileno.

D- Nesta eletromicrografia, é possível observar que as regiões mais claras entre as células, observadas na fig.C, correspondem a interdigitações (*). N- núcleo. mi- mitocôndria. Li- inclusão lipídica. J- junção. MET.

E- Notar que as células são positivas para PAS. Presença de substância amorfa (S), na luz das glândulas.

F- Grande quantidade de inclusões lipídicas são observadas no citoplasma das células que constituem as glândulas, mostradas pelas reações por Sudan Black.

PROJETO EM ANDAMENTO: NEUROINVASIVIDADE E NEUROVIRULÊNCIA DO VÍRUS DA RAIVA EM AMOSTRAS DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE BOVINOS

CENTOAMORE, NATALIA HELENA FRADA¹; MAIORKA, PAULO CÉSAR¹; ASANO, KAREN MIYUKI²; ACHKAR, SAMIRA MARIA²; SCHEFFER, KARIN CORRÊA²; FAHL, WILLIAN DE OLIVEIRA²; MORI, CLÁUDIA MADALENA CABRERA¹; MORI, ENIO²

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

² Instituto Pasteur, São Paulo, SP, Brasil.

Introdução e Objetivos: A raiva está presente em todo o território brasileiro e possui importância na maioria dos estados, seja pelo seu caráter zoonótico (saúde pública), ou pelo seu caráter econômico, uma vez que é responsável por perdas à pecuária. O ataque de morcegos hematófagos aos bovinos acarreta em sérios prejuízos à pecuária, pois além dos animais mortos pela doença, os agredidos perdem peso e apresentam lesões em diversas partes do corpo, o que prejudica a qualidade do couro.[1] O vírus da raiva (RABV) não infecta todas as estruturas do sistema nervoso central (SNC) de modo uniforme. Vários estudos com resultados discordantes discutem quais seriam os fragmentos mais indicados para a detecção de antígenos virais. Os fragmentos que contêm antígenos de RABV com maior frequência podem variar de acordo com a patogenicidade, tropismo da amostra viral em questão e de acordo com a espécie animal.[2] O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), recomenda que para o diagnóstico da raiva sejam enviados fragmentos do cerebelo, córtex, medula oblonga, hipocampo e tálamo. [3] Com base nesses dados, o presente estudo foi delineado para verificar a neuroinvasividade, neurovirulência e carga viral do RABV em amostras de SNC de bovinos provenientes do Setor de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur.

Materiais e Métodos: Serão utilizadas amostras de encéfalo (tálamo, córtex, cerebelo e tronco encefálico – mesencéfalo, bulbo e ponte) de bovinos naturalmente infectados, provenientes do Setor de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur, durante o período de abril de 2015 a abril de 2016. A confirmação da presença do antígeno do vírus da raiva será realizada com o emprego da reação de imunofluorescência direta, tendo como parâmetros a distribuição antigênica e a intensidade das reações. O isolamento viral, tanto por inoculação intracerebral em camundongos, quanto em cultura celular (células de neuroblastomamurino - N2A), será realizado pelo Setor de Virologia do Laboratório de Diagnóstico do Instituto Pasteur/SP. Além destas técnicas de confirmação da presença de antígeno viral, também serão realizadas a imunistoquímica, a RT-PCR convencional e a RT-PCR em tempo real, que permitirão a obtenção da carga viral. Os fragmentos serão submetidos à avaliação histopatológica com a coloração de HE. **Resultados parciais:** Até o presente das amostras de SNC colhidas de 59 bovinos houve 16 animais que apresentaram positividade para o antígeno do vírus da raiva na técnica de IFD, representando 26,7% do total.

Há muita discussão a respeito da melhor região do SNC a ser utilizada para a realização do diagnóstico da raiva pela demonstração da presença de antígeno viral. A observação de uma distribuição antigênica mais na região de bulbo olfatório, tálamo e córtex, além disso o cerebelo apresentaria uma distribuição irregular e em pequena quantidade, variando de fraco positivo a negativo.⁴ Porém, de acordo com o que pôde ser observado até o presente momento, o cerebelo não possui uma intensidade antigênica distinta das outras regiões analisadas (Tabela 1)

Há indicações de que a região de predileção de maior intensidade antigênica do RABV seria o tronco encefálico e particularmente o tálamo, sendo que outras regiões, como hipocampo, cerebelo e córtex poderiam resultar em falsos negativos.[3]

Tabela 1 – Intensidade da distribuição antigênica do vírus da raiva, avaliada pela reação de imunofluorescência direta aplicada a fragmentos do Sistema Nervoso Central de Bovinos segundo a região examinada

| | Bulbo | Cerebelo | Córtex | Hipocampo | Mesencéfalo | Medula Oblonga | Ponte | Tálamo |
|----|-------|----------|--------|-----------|-------------|----------------|-------|--------|
| 1 | NT | NT | ++ | +++ | + | NT | NT | + |
| 2 | ++ | + | + | + | NT | NT | NT | ++ |
| 3 | +++ | ++++ | ++++ | +++ | +++ | + | +++ | ++++ |
| 4 | NT | NT | +++ | NT | NT | NT | NT | NT |
| 5 | NT | NT | +++ | NT | NT | NT | NT | NT |
| 6 | ++ | ++ | +++ | ++++ | ++++ | NT | NT | ++++ |
| 7 | NT | + | +++ | ++ | ++ | NT | NT | ++ |
| 8 | NT | NT | ++ | ++ | ++++ | NT | NT | +++ |
| 9 | ++ | + | ++ | ++ | +++ | NT | + | +++ |
| 10 | +++ | +++ | +++ | +++ | NT | NT | NT | NT |
| 11 | NT | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | NT | NT | +++ |
| 12 | ++ | ++++ | ++++ | +++ | NT | NT | + | NT |
| 13 | ++++ | ++++ | +++ | +++ | ++++ | +++ | + | ++++ |
| 14 | NT | +++ | +++ | ++ | +++ | NT | NT | ++ |
| 15 | +++ | ++++ | +++ | ++++ | ++++ | NT | +++ | ++++ |
| 16 | +++ | + | + | + | +++ | NT | + | +++ |

NT: Fragmento ausente.

Com o que pôde ser observado até o momento as regiões com a melhor intensidade antigênica foram cerebelo, mesencéfalo e tálamo, indicando a importância dessas regiões, principalmente quando, por exemplo é considerado o animal 16, uma vez que a observação de uma intensidade 1 (+) cerebelo, córtex e hipocampo, poderia levar a resultados falsos negativos. Porém não podem ser excluídas as demais estruturas importantes para o diagnóstico do antígeno do RABV, principalmente quando é considerado o caso dos animais 4 e 5, em que apenas o córtex foi enviado para análise.

A análise da distribuição da intensidade é importante uma vez que nem todas as amostras de SNC recebidas apresentam todas as estruturas (Tabela 2).

Tabela 2 – Estrutura do Sistema Nervoso Central de bovinos encaminhada para a realização do diagnóstico laboratorial da raiva

| ESTRUTURA | QUANTIDADE | |
|----------------|------------|--------|
| Bulbo | 30/59 | 50,8% |
| Cerebelo | 46/59 | 77,97% |
| Córtex | 58/59 | 98,31% |
| Hipocampo | 54/59 | 91,53% |
| Medula Oblonga | 06/59 | 10,17% |
| Mesencéfalo | 49/59 | 83,05% |
| Ponte | 27/59 | 45,76% |
| Tálamo | 51/59 | 86,44% |

Quanto ao isolamento viral, dos 57 bovinos trabalhados até o presente, pelo menos os animais que apresentaram positividade na IFD também apresentaram positividade no isolamento viral, em pelo menos uma das técnicas, cultivo celular ou inoculação intracerebral em camundongos (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados dos exames laboratoriais aplicados ao diagnóstico da raiva em materiais provenientes de bovinos, segundo o tipo de exame laboratorial efetuado

| | IFD | Cultivo Celular | Inoculação em Camundongos |
|----|----------|-----------------|---------------------------|
| 1 | Positivo | Positivo | - |
| 2 | Positivo | Positivo | - |
| 3 | Positivo | Positivo | - |
| 4 | Positivo | Positivo | - |
| 5 | Positivo | Positivo | - |
| 6 | Positivo | Positivo | - |
| 7 | Positivo | Positivo | - |
| 8 | Positivo | Positivo | - |
| 9 | Positivo | Positivo | - |
| 10 | Positivo | - | Positivo |
| 11 | Positivo | Positivo | Positivo |
| 12 | Positivo | Positivo | - |
| 13 | Positivo | Positivo | - |
| 14 | Positivo | Positivo | - |
| 15 | Positivo | Positivo | - |
| 16 | Positivo | Positivo | - |

Os animais que apresentaram positividade para o antígeno viral do RABV foram a óbito em sua maioria por morte natural (62,5%), após um período médio de evolução da doença de 104 horas. Os animais acometidos tinham em média 18 meses de idade, sendo que dos 16 bovinos, oito foram vacinados contra a raiva e destes a metade, recentemente, indicando que talvez os animais não tivessem desenvolvido a imunidade necessária para impedir a instalação e o desenvolvimento da doença.

Os animais eram provenientes principalmente da região fronteira com o estado de Minas Gerais, região considerada pelo Escritório de Defesa Agropecuária (EDA) como área epidêmica para a ocorrência de raiva (12/16), os outros casos eram originários da área considerada como endêmica (4/16). Os locais de procedência são apresentados na tabela 4.

| Origem | |
|---------------------|---|
| Franca | 1 |
| Ituverava | 1 |
| Patrocínio Paulista | 1 |
| Itatiba | 2 |
| Itararé | 3 |
| Socorro | 8 |

Tabela 4 – Municípios de origem dos bovinos, cujo sistema nervoso central foi enviado ao Instituto Pasteur de São Paulo, para a realização de provas laboratoriais aplicadas ao diagnóstico da raiva

Conclusões: Até o presente, dentre os fragmentos do SNC de bovinos, examinados para a confirmação do diagnóstico da raiva os que apresentaram a maior intensidade de marcação antigênica na IFD foram cerebelo, mesencéfalo e tálamo. Além disso, o caso em que a positividade pela IFD nas regiões preconizadas pelo MAPA foi fraca, ou seja, foram observadas poucas inclusões virais, poderia ter resultado em um falso negativo, o que ressalta a importância de que pelo menos uma parte do tronco encefálico também seja encaminhada para o diagnóstico da raiva.

O isolamento viral em cultivo celular foi menos sensível que a técnica de IFD, mas é importante salientar que o cultivo celular ainda não foi totalmente padronizado para herbívoros, o que pode explicar tal resultado.

Apoio financeiro: O presente estudo tem auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (133132/2015-3) e Instituto Pasteur/SP.

Referências

[1] ACHKAR, S. M. et al. Sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica em fragmentos de sistema nervoso central de bovinos e equinos naturalmente infectados pelo vírus da raiva. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 211-218, Mar. 2010.

[2] MARTELL M. A. Estudio de inmunofluorescencia de diferentes segmentos de encéfalos de bovinos muertos de rabia paralytica o derriengueen forma natural e inoculados experimentalmente. *Tec Pec Mex.*, v. 12, p. 24-27, 1969.

[3] MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual técnico:** procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central dos bovinos. Brasília: MAPA/SDA/DDA, 2003. 50 p.

[4] BINGHAM, J.; VAN DER MERWE, M. Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibodytest. *J Virol Methods*, v. 101, n. 1-2, p. 85-94, 2002.

CASTRACÃO QUÍMICA DE GALOS ADULTOS: MODELO ANIMAL PARA CONTROLE POPULACIONAL DE AVES SINANTRÓPICAS

OLIVEIRA, MIRELA CAROLINE VILELA¹; KAWAOKU, ALISSON JUN TAGUCHI¹; FREDIANI, MAYRA HESPANHOLI¹; FERNANDES, CRISTIANO ALVES²; PEREIRA, RICARDO JOSÉ GARCIA¹; MARQUES DE SÁ, LILIAN ROSE¹; KNOBL, TEREZINHA¹

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

² Médico Veterinário autônomo.

Introdução e Objetivos: Estudos sobre castração química no Brasil referem-se à espécie canina e apresentam resultados promissores, sendo considerada atualmente como uma nova alternativa para o controle populacional desta espécie.[1],[2] Os trabalhos sobre caponização de aves podem ser uma alternativa para o controle populacional de pombos e outras espécies sinantrópicas. Desta forma, o presente trabalho propõe o galo como modelo animal para avaliação dos efeitos da castração química.

As condições climáticas e a disponibilidade de alimentos no Brasil são características que propiciam ao país uma alta biodiversidade de fauna e flora. Fatores ambientais, educacionais e sanitários estão relacionados direta ou indiretamente com a presença de animais sinantrópicos nos grandes centros urbanos, os quais podem representar um risco de saúde pública, quando participam como fontes de infecção ou reservatórios de doenças de caráter zoonótico.[3]

Até o momento são descritas mais de 200 zoonoses, sendo geradas por diversos

patógenos (bactérias, vírus, fungos, parasitas).[4] Muitas destas zoonoses estão associadas à presença de pombos em áreas urbanas e a tentativa de controle populacional por leigos têm tornado frequentes os relatos de envenenamento. Em decorrência dos diversos transtornos gerados pelos animais sinantrópicos foi instituída a Instrução Normativa Ibama nº 141 de 19 de dezembro de 2006 que tem a finalidade de regulamentar o controle e o manejo ambiental da fauna sinantrópica nociva.

Perante a deficiência de medidas eficientes de controle populacional, o presente trabalho foi delineado para analisar os efeitos da castração química com gluconato de zinco em galos adultos como método alternativo para espécies que apresentam exacerbado crescimento populacional, e que representam risco à saúde pública.

Materiais e Métodos: Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso Animal da FMVZ-USP. O produto utilizado para castração química foi o Infertile®, composto por gluconato de zinco e dimetilsulfoxido (DMSO).

Foram utilizados cinco galos adultos da linhagem Hisex. O procedimento adotado para a avaliação da produção de espermatozoides e o efeito da castração foi a realização de uma análise espermática semanal durante três semanas antes e três semanas após a intervenção cirúrgica, totalizando 6 análises. O sêmen foi coletado por meio de massagem manual.[5] Após a coleta, o sêmen foi diluído para análise de motilidade e vigor. A concentração espermática foi determinada em câmara de Neubauer com 10 µL de sêmen diluído em formol salina (FS). O mesmo volume foi utilizado para análise morfológica em câmara úmida. A integridade de membrana foi testada com uso de corantes eosina e nigrosina, cujo protocolo adotado foi de 5µL de eosina/nigrosina misturadas com 5µL de sêmen diluído por cerca de 30 segundos.

Após as avaliações as aves foram submetidas à técnica de laparoscopia com uso de anestesia inalatória (máscara de isoflurano). Realizada uma incisão de 3 cm na pele entre o segundo e terceiro espaço intercostal, divulsão do músculo e traçionamento das costelas para aplicação intratesticular de 200µL do Gluconato de Zinco (Infertile®). A síntese do espaço intercostal e da pele foi realizada com fio nylon 2.0, em ponto simples contínuo. A avaliação de dor foi realizada desde o momento da indução anestésica até 72 horas de pós-cirúrgico. Decorridos 70 dias da aplicação do infertile, os animais foram submetidos a eutanásia e os seus testículos foram coletados para a realização do exame histopatológico. Os testículos foram mantidos em fixador metacarn, emblocados em parafina e as lâminas coradas com hematoxilina/eosina.

Resultados e Discussão: A dose do produto injetada normalmente é associada ao tamanho do testículo dos animais, sendo a menor dose de 0,5mL em cães filhotes.[1] Devido à ausência de parâmetro para aves, foi inferido, com base no tamanho testicular, um volume 0,2mL injetado em cada testículo. O tempo cirúrgico foi, em média, de 20 minutos para cada lado. A técnica foi considerada simples, mas o custo de anestésicos foi elevado. A dificuldade de acesso e o risco de sangramento também devem ser considerados como aspectos limitantes da técnica para uso em populações.

No momento cirúrgico os parâmetros avaliados para análise de dor foram frequência cardíaca, frequência respiratória e pressão arterial. Após a cirurgia foram observados o comportamento dos animais segundo a escala de dor proposta por Paula e Sakai,[6] na qual obtiveram resultado negativo para dor. Os dados do espermiograma são apresentados na tabela 1. Observou-se azospermia em 2/5 galos na primeira coleta, com diminuição da resposta à massagem manual. Outros dois animais apresentaram comportamento de choco e diminuição da vocalização, mas mantiveram-se responsivos à massagem cloacal. Apenas uma ave manteve o seu comportamento reprodutivo preservado. Todas as aves tiveram diminuição do vigor e concentração espermática. Em relação à morfologia, houve aumento de defeitos maiores, os quais estão relacionados com a capacidade de fertilização.