

Hélio Lauro Soares Vasco Neto

**ESTUDO DA CITOLOGIA E MICROBIOTA CONJUNTIVAL FÚNGICA DE ÉGUAS
QUARTO DE MILHA ORIUNDAS DA ZONA DA MATA E AGRESTE
PERNAMBUCANOS**

RECIFE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Hélio Lauro Soares Vasco Neto

**ESTUDO DA CITOLOGIA E MICROBIOTA CONJUNTIVAL FÚNGICA DE ÉGUAS
QUARTO DE MILHA ORIUNDAS DA ZONA DA MATA E AGRESTE
PERNAMBUCANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

RECIFE

2016

Hélio Lauro Soares Vasco Neto

ESTUDO DA CITOLOGIA E MICROBIOTA CONJUNTIVAL FÚNGICA DE ÉGUAS
QUARTO DE MILHA ORIUNDAS DA ZONA DA MATA E AGRESTE PERNAMBUCANOS

Dissertação de Mestrado

Data de aprovação: 29/02/2016

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá - Presidente
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE)

Prof. Dr. Moacir Bezerra de Andrade
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE)

Prof^a. Dr^a. Luciana de Oliveira Franco
(Departamento de Biologia – UFRPE)

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE)

*"A compaixão para com os animais é uma das
mais nobres virtudes da natureza humana."*

(Charles Darwin)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente na minha vida, dando-me força, coragem e sabedoria.

A minha família, pelo carinho, amor e paciência, não medindo esforços para ajudar-me sempre que necessário.

A minha noiva Ana Caroline Cerqueira, sempre compreensiva, sem dúvida meu pilar de sustentação, me ajudando em todos os aspectos, estando sempre ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá pela confiança, orientação, paciência e amizade.

A Prof^a. Dra. Rejane Pereira Neves e equipe do Laboratório de Micologia Médica e Veterinária da UFPE.

A todos os amigos que fazem parte do Laboratório de Oftalmologia Experimental da UFRPE.

A UFRPE, PPGBA e CAPES por tornar possível a realização desta dissertação.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os cavalos, entre as espécies animais, são os mais predispostos a desenvolver a ceratite fúngica, principalmente devido a conformação proeminente do globo ocular e ao grande número de microrganismos existentes no ambiente. Mais de 30 gêneros de fungos podem causar ceratomicose nos cavalos, sendo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium* os principais. Objetivou-se com o presente trabalho. Isolar e identificar sazonalmente os fungos localizados na conjuntiva ocular de éguas da raça Quarto de Milha, saudáveis, submetidas aos tipos de manejo extensivo e intensivo, provenientes da zona da mata e agreste pernambucanos, realizar avaliação citológica da conjuntiva ocular das éguas submetidas ao exame microbiológico, comparar os achados entre as estações do ano e os tipos de manejo submetidos e relacionar a quantidade e tipos celulares com a presença de fungos. Para tal, avaliou-se a microbiota fúngica e os aspectos celulares da mucosa do saco conjuntival do olho direito de 64 éguas da raça quarto de milha, provenientes de propriedades oriundas da Zona da Mata e Agreste Pernambucanos. Os animais foram submetidos ao exame clínico geral e oftálmico de rotina previamente as coletas. Para a identificação microbiológica foram coletadas amostras utilizando um Swab seco estéril, as quais foram semeadas em meio de cultura contendo agar Sabouraud com cloranfenicol. Das amostras analisadas 36 (56,25%) foram positivas para presença de fungos. Deste total, 47,5% apresentaram fungos do gênero *Aspergillus*, 10% *Fusarium*, 10% *Penicillium*, 10% *Curvularia*, 10% *Alternaria*, 7,5% *Rhizopus* e 5,0% *Mucor*. A citologia conjuntival revelou um predomínio das células epiteliais, contendo um maior número de células da camada intermediária (80,61%). Conclui-se que as características climáticas do inverno pernambucano proporcionaram melhores condições para o desenvolvimento fúngico conjuntival em equinos hípidos, independente do tipo de manejo e região. O número e tipo de células do saco conjuntival não são influenciados pelas condições climáticas, tipo de manejo e regiões. Pode-se concluir também que essa presença de fungos não interfere no número e nos tipos de células da conjuntiva.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Oftalmologia, cavalos, micobiota, ceratomicose, citologia conjuntival.*

ABSTRACT

The horses, among animal species are more likely to develop keratitis, mainly due prominent conformation of the eyeball and the large number of microorganisms existing in the environment. More than 30 genera of fungi can cause Keratomycosis in horses, being the main ones the *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, and *Fusarium*. This study aimed to isolate and seasonally (summer and winter) identify fungal microorganisms located in the ocular conjunctiva of healthy Quarter Horse mares, under different types of management (extensive and intensive), from Pernambuco Forest Zone and Agreste area, to conduct cytological assessment of mares ocular conjunctival submitted to microbiological examination, to compare the findings between the seasons and the types of subjected management, and to relate the quantity and cell types with the presence of fungi. To this end, it was evaluated the fungal microbiota and cellular aspects of the surface layer of the conjunctival sac of the right eye of 64 Quarter Horse mares, all derived from the properties of Pernambuco Forest Zone and Agreste Area. The animals were submitted to general and ophthalmic clinic examination before the sampling. To the microbiological identification, the samples were collected using a dry sterile swab, which was rolled in a culture medium containing Sabouraud agar with chloramphenicol. Of all analyzed samples, 36 (56.25%) were positive for the presence of fungi. Of this total, 47,5% were positive for the presence of fungi of the *Aspergillus* genus, 10% *Fusarium*, 10% *Penicillium*, 10% *Curvularia*, 10% *Alternaria*, 7,5% *Rhizopus* and 5.0% *Mucor*. The conjunctival cytology revealed a predominance of epithelial cells containing a greater number of cells of the intermediate layer (80.61%). It can be concluded that the climatic characteristics of Pernambuco winter provide better conditions for fungal conjunctival development in healthy horses regardless the management type, and that the number and type of conjunctival sac cells are not affected by weather conditions, management type and regions. It can also be conclude that fungal presence does not interfere in the number and types of conjunctival cells.

INDEX TERMS: *Ophthalmology, horses, micobiota, keratomycosis, conjunctival citologyc.*

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Ilustrações	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas e siglas	xi
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. A origem do cavalo e equideocultura	14
2.2. Sistema visual dos equinos	15
2.3. Aspectos anatômicos das estruturas oculares	16
2.4. Citologia conjuntival	18
2.5. Microbiota fúngica conjuntival e a ceratomicose	22
3. REFERÊNCIAS	24
4. ARTIGO I	32
4.1. ESTUDO DA CITOLOGIA E MICROBIOTA CONJUNTIVAL FÚNGICA DE ÉGUAS ORIUNDAS DA ZONA DA MATA E AGRESTE PERNAMBUCANOS	32
5. ANEXOS	50

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Campo visual do cavalo. Fonte: Gilger (2005)	14
Figura 2. Estruturas internas e anexas do globo ocular. Fonte: Slatter (2005)	16
Figura 3. Diferentes instrumentos para coleta de amostra citológica conjuntival. Da esquerda para a direita: swab de algodão, espátula, lâmina de bisturi e escova de citologia. Fonte: Rito (2009)	18
Figura 4. Microscopia óptica da citológica conjuntival esfoliativa em equinos hígdos. Observa-se diferentes tipos celulares do epitélio conjuntival. Corante Rosenfeld Fonte: LOE –UFRPE (2015)	19
Figura 5. Lâmina citológica de um bovino com conjuntivite aguda. Observa-se o a predominância de neutrófilos. Giemsa 200x. Fonte: Rocha <i>et al.</i> (2001)	20

ARTIGO I

Figura 1. Presença de fungos em amostras da mucosa conjuntival de éguas da raça Quarto de Milha saudáveis submetidas a diferentes regiões, tipos de manejo e estações do ano. Int. (Intensivo) e Ext. (Extensivo)	39
Figura 2. Microscopia óptica da citológica conjuntival, pelo método esfoliativo, em equinos hígdos. Diferentes tipos celulares do epitélio conjuntival. Corante Rosenfeld Fonte: LOE – UFRPE (2015)	40

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1. Temperatura e umidade média da Zona da Mata e Agreste Pernambucano nas estações de inverno e verão durante a realização das coletas (Fonte: APAC, 2015)	35
Tabela 2. Fungos isolados das conjuntivas de cavalos oriundos da Zona da Mata e Agreste Pernambucano, submetidos ao manejo extensivo e intensivo durante os períodos de inverno e verão.....	38
Tabela 3. Fungos isolados das amostras oriundas da Zona da Mata – PE, de animais submetidos ao manejo intensivo e extensivo no período do inverno e verão.....	38
Tabela 4. Fungos isolados das amostras oriundas do Agreste – PE, de animais submetidos ao manejo intensivo e extensivo no período do inverno e verão.....	39
Tabela 5. Número de células conjuntivais coletadas no inverno e verão do olho direito de 64 éguas saudáveis, oriundas da Zona da Mata e Agreste Pernambucano	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
APAC	Agência Pernambucana de Águas e Clima
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DMFA	Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Ed.	Edição
EUA	Estados Unidos da América
Kg	Quilograma
L	Litros
LOE	Laboratório de Oftalmologia Experimental
Ltda.	Limitada
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligramas
mL	Mililitro
P.A.	Puro para análise
PE	Pernambuco
sp.	Uma espécie do gênero
SPRD	Sem Padrão Racial Definido
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
v.	Volume
%	Porcetagem
°C	Graus Celcius

1. INTRODUÇÃO

O cavalo é um dos poucos mamíferos que tolerou as frequentes transformações pelas quais passou o planeta. Logo após sua domesticação teve um papel importante ao longo das civilizações. Foi primordial no desenvolvimento da agricultura, nas construções de cidades e nas ofensivas militares (RICCIARDI *et al.*, 2014).

O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo e o primeiro da América Latina onde, somados aos muare e asininos aproxima-se dos 8 milhões de cabeças, movimentando cerca de R\$ 7,3 bilhões anuais. Mais de 30 segmentos, distribuídos entre insumos, criação e destinação final, compõem a base desse mercado chamado “Complexo do Agronegócio do Cavalo”, que é responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2014).

O olho, órgão da visão, é formado pelo globo ocular e várias estruturas anexas, tais como músculos, aparelho lacrimal, pálpebras, conjuntiva, cristalino, humor aquoso e humor vítreo. A conjuntiva é uma delgada membrana mucosa, transparente, móvel e ricamente vascularizada que recobre toda superfície interna das pálpebras (conjuntiva palpebral), a esclera (conjuntiva bulbar) e toda a terceira pálpebra. O espaço formado entre a conjuntiva palpebral e bulbar é chamada de saco conjuntival (SANTO, 2012).

A conjuntiva e a córnea têm um eficiente sistema de defesa contra infecções. Este sistema é formado por mecanismos metabólicos, imunológicos, antimicrobianos e por uma barreira física. Um desequilíbrio de qualquer um destes fatores pode submeter o olho a uma possível infecção por patógenos oportunistas, colonizando e infectando o estroma corneano (ANDRADE *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2011).

Desde o seu nascimento, o animal apresenta em seu saco conjuntival grande variedade de microrganismos, tais como vírus, bactérias e fungos, os quais formam a microbiota ou flora conjuntival normal (PISANI *et al.*, 1997). Muitos fatores podem afetar a presença ou ausência da microbiota ocular. Condições edafoclimáticas, ambiente e manejo têm sido sugeridos como variáveis potenciais, afetando carga microbiana em olhos de cavalos normais e doentes (ANDREW *et al.*, 2003).

As ceratites fúngicas são comuns em humanos e, dentre as espécies animais, a equina é a mais susceptível, sendo uma das principais alterações oftalmológicas que acometem esta espécie. Sua maior predisposição é devido a conformação proeminente do globo ocular e às deficiências imunoprotetoras inatas do filme lacrimal, juntamente com a comumente elevada concentração de fungos nos ambientes de criação (NARDONI *et al.*, 2007; WADA *et al.*, 2010).

Estudos demonstram que cerca de 100% dos cavalos hípidos podem abrigar fungos no saco conjuntival (MACHADO *et al.*, 2005). Mais de 30 gêneros de fungos causam ceratomicose nos equinos. O uso de antibióticos tópicos e a utilização inadequada de corticosteróides tópicos na terapia das úlceras de córnea podem provocar ou agravar os sinais clínicos da ceratite fúngica nos cavalos (ROSA *et al.*, 2003).

O diagnóstico baseia-se no exame oftalmológico, exame citológico e cultura microbiológica. O tratamento vai depender da gravidade das lesões, sendo as intervenções tópica e cirúrgica as mais comuns, podendo ser recomendado em casos mais graves a ceratectomia (CAFARCHIA *et al.*, 2013).

A citologia conjuntival consiste em um importante método não invasivo que auxilia no diagnóstico e no direcionamento terapêutico das patologias oculares superficiais (BARROS *et al.*, 2001; BRANDÃO *et al.*, 2002; CAMARGO *et al.*, 2004). Segundo Dutra *et al.* (2005) e Borges *et al.* (2012), trata-se de um exame simples, rápido e de baixo custo que não deve ser dispensado, principalmente na presença de conjuntivites, abscessos e nodulações conjuntivais.

Considerado o exposto, os objetivos desta pesquisa foram: Isolar e identificar sazonalmente os fungos localizados na conjuntiva ocular de éguas da raça Quarto de Milha, saudáveis, submetidas aos tipos de manejo extensivo e intensivo, provenientes da zona da mata e agreste pernambucanos, realizar avaliação citológica da conjuntiva ocular das éguas submetidas ao exame microbiológico, comparar os achados entre as estações do ano e os tipos de manejo submetidos e relacionar a quantidade e tipos celulares com a presença de fungos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A origem do cavalo e equideocultura

O cavalo é um dos poucos mamíferos que tolerou, durante milhões de anos, as frequentes transformações pelas quais passou o planeta. Estudos comprovam que a espécie vem evoluindo há mais 55 milhões de anos, passando de animais que mediam cerca de 30 centímetros de altura até tornarem-se o sofisticado cavalo moderno (RICCIARDI *et al.*, 2014).

Os equinos, ao contrário da maioria das demais espécies, foram domesticados por suas grandes habilidades de locomoção e trabalho. Logo, tiveram papel importante ao longo das civilizações. Foram primordiais no desenvolvimento da agricultura, nas construções de cidades e nas ofensivas militares. No Brasil, a equideocultura sempre desempenhou um respeitável papel e seu valor pode ser observado desde os tempos do Brasil-Colônia, quando os cavalos participaram de todos os ciclos extrativistas e agrícolas, interferindo diretamente para a formação econômica, política e social do país (ZANINE *et al.*, 2006; SOUSA, 2008).

A partir da segunda metade do século XX, quando os equídeos foram sendo substituídos por motores, a criação de equídeos começou a destacar-se no aspecto sociocultural, nas atividades de esportes e lazer, assim como no tratamento de portadores de dificuldades na área cognitiva e psicomotora através da equoterapia (ALMEIDA & SILVA, 2010; BRANDÃO *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2014).

O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo e o primeiro da América Latina, onde somados aos muares e asininos aproxima-se dos 8 milhões de cabeças, movimentando cerca de R\$ 7,3 bilhões anuais. Mais de 30 segmentos, distribuídos entre insumos, criação e destinação final, compõem a base desse mercado, que é chamado “Complexo do Agronegócio do Cavalo”, sendo responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2014).

De acordo com Sebrae (2012), a equideocultura pernambucana vem conquistando representatividade e expressão no âmbito nacional. Hoje, detém o décimo quarto maior rebanho do Brasil, sendo o décimo primeiro em densidade populacional. O estado se destaca tanto em provas de andamento e morfologia das raças Campolina e Mangalarga Machador, como também

nas diversas atividades equestres, tais como o hipismo clássico e as provas atléticas do Quarto de Milha, incluindo a vaquejada.

2.2. Sistema visual dos equinos

As informações recebidas do ambiente externo ao organismo são constantemente enviadas ao sistema nervoso central através da captação dos órgãos dos sentidos. O sistema visual é uma modalidade sensorial de fundamental importância para realização das atividades básicas dos mamíferos superiores. Os cavalos, presas naturais, possuem um amplo campo de visão, que parece ter evoluído por conta da necessidade de detecção dos movimentos de seus predadores. (HANGGI & INGERSOLL, 2012; LEITE *et al*, 2013).

Os cavalos são ativos em qualquer horário do dia ou da noite e possuem acuidade visual tanto sob alta ou baixa luminosidade. Sua visão para cores é dicromática, apresentam cones de onda curta e médio-longa, sensíveis ao azul e ao vermelho. Possuem um vasto campo visual chegando até 178 graus de visão vertical e 350 graus horizontal, sendo esta última de 55 a 65 graus de sobreposição binocular e aproximadamente 146 graus de visão monocular lateral (Figura 1). Com isso, os equinos apresentam uma esfera quase completa de visão em torno do seu corpo. (PICK *et al.*, 1994; SLATTER, 2005; HAHGGI & INGERSOLL, 2012; SPAAS *et al.*, 2014; GOLOUBEFF, 2015)

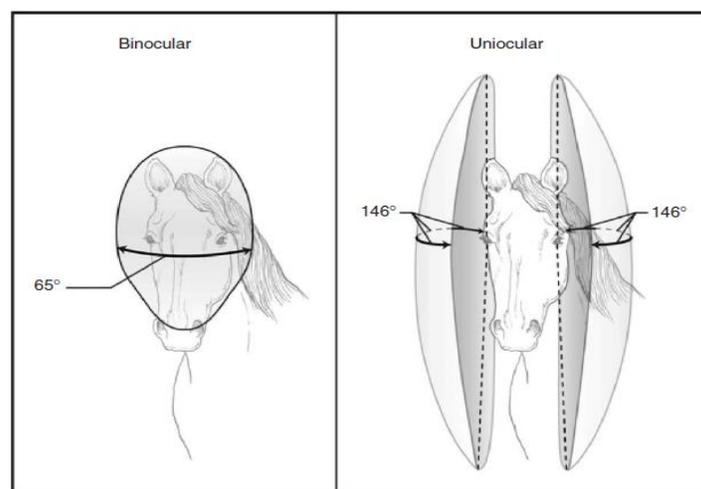


Figura 1. Campo visual do cavalo. Fonte: Gilger (2005).

Além destes mecanismos, os cavalos apresentam um número de outras adaptações que os humanos não possuem e que melhoram a visão em locais com pouca luminosidade. Esses animais tem um dos maiores olhos entre os vertebrados terrestres e isto permite que mais luz seja captada pela retina. A entrada de luz para o olho é ainda reforçada por conta do alongamento horizontal da pupila e pela capacidade de a pupila dilatar, cerca de seis vezes mais do que a de uma pupila humana (GILGER, 2005).

2.3. Aspectos anatômicos das estruturas oculares

O olho, órgão da visão, é formado pelo bulbo ocular e várias estruturas anexas, tais como músculos, aparelho lacrimal, pálpebras e conjuntiva (Figura 2). O bulbo é composto por três túnicas que possuem estrutura e função próprias, a camada mais externa é representada pela túnica fibrosa (esclera e córnea) que sustenta os componentes internos e dá a forma ao olho. A túnica média ou vascular é composta pela úvea ou trato uveal (íris, corpo ciliar e coróide) e a terceira túnica é representada pela túnica nervosa composta pela retina e pelo nervo ótico que captam e transmitem os impulsos nervosos sensoriais ao cérebro. Igualmente, o humor aquoso e o vítreo permitem a difusão de nutrientes e fatores de crescimento através do bulbo do olho. A função ocular adequada requer relação anatômica precisa entre as suas várias partes constituintes (CARASTRO, 2004; SLATTER, 2005).

As pálpebras são estruturas formadas por duas pregas de pele fina e flexível, uma superior e outra inferior, que surgem nas margens ósseas da órbita e, como cortinas, são intermitentemente dirigidas sobre a parte exposta do olho. O espaço formado entre elas é chamado de fissura palpebral. Os cantos mediais e laterais são formados a partir do encontro dos bordos livres das pálpebras dorsais e ventrais (GILGER, 2005; LEITE *et al.*, 2013).

De acordo com Gelatt (1999), as pálpebras possuem estruturas especializadas como os cílios, glândulas produtoras de muco e conjuntiva. Essas estruturas promovem proteção mecânica, limpeza da superfície anterior do globo ocular, regulação da entrada de luz e previne a desidratação da córnea através da distribuição da secreção lacrimal.

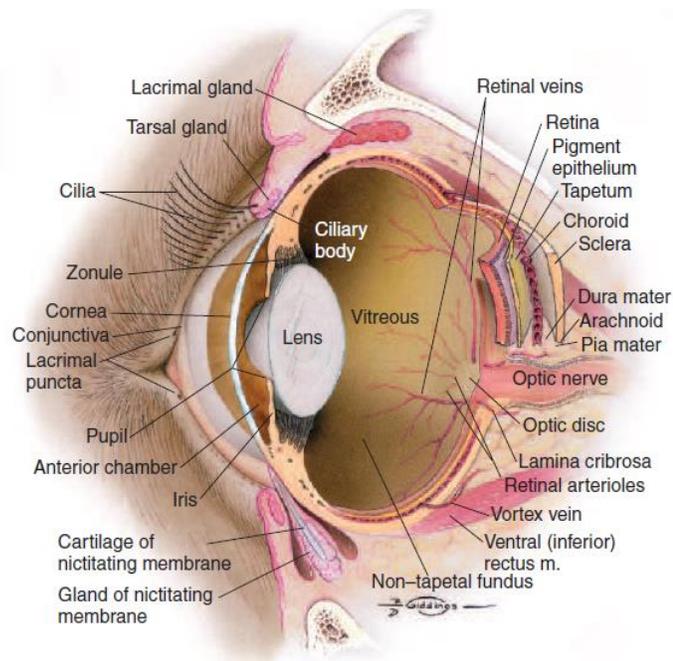


Figura 2. Estruturas internas e anexas do bulbo ocular. Fonte: Slatter (2005).

A estrutura e a rigidez da pálpebra são fornecidas através do tarso, que é uma camada densa de tecido conjuntivo localizado entre a conjuntiva palpebral e os músculos da palpebras. O tarso é maior e mais firme na pálpebra superior, em comparação com a da pálpebra inferior, possui as glândulas meibonianas ou tarsais que contribuem para o componente lipídico do filme lacrimal (GILGER, 2005; SLATTER, 2005).

A terceira pálpebra ou membrana nictitante é um fino tecido que está localizado no canto medial do olho dos equinos. Ela é uma estrutura de proteção móvel, posicionada entre a córnea e a pálpebra inferior, no canto nasal da pálpebra inferior. Por possuir uma musculatura vestigial, a sua movimentação se dá passivamente quando ocorre a retração do bulbo ocular (CUNHA, 2008; LEITE *et al.*, 2013).

A constituição histológica das pálpebras, da camada externa para a interna, começa com a pele formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e derme de tecido conjuntivo, fibras musculares estriadas, tecido conjuntivo denso formando a placa palpebral, na qual se encontram as glândulas sebáceas e sudoríparas modificadas e, por fim, constituindo a mucosa tem um epitélio prismático estratificado (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A conjuntiva é uma delgada membrana mucosa, transparente, móvel e ricamente vascularizada que recobre toda superfície interna das pálpebras (conjuntiva palpebral), a esclera (conjuntiva bulbar) e toda a terceira pálpebra. O espaço formado entre a conjuntiva palpebral e bulbar é chamada de saco conjuntival (GELATT, 1999; BROOKS, 2005; SANTO, 2012).

Histologicamente a conjuntiva palpebral é revestida por um epitélio colunar pseudo-estratificado com presença de grande quantidade de células caliciformes e um epitélio escamoso estratificado não queratinizado que reveste a conjuntiva bulbar. Além disso, perto do limbo, existe uma agregação de folículos linfóides e linfáticos, que é parte integrante da resposta imune ocular (RASKIN & MEYER, 2003; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; GILGER, 2005).

A conjuntiva é uma estrutura resistente e altamente regenerativa que desempenha um papel na dinâmica lacrimal, na proteção imunológica do olho, nos movimentos oculares e na cicatrização da córnea, onde é usada com frequência para tratar lesões ulcerativas. (GELATT, 1999; CARASTRO, 2004).

2.4. Citologia conjuntival

A conjuntiva é sede de lesões de etiologias variadas, onde destacam-se as alterações circulatórias, degenerativas, neoplásicas e inflamatórias, cujo diagnóstico diferencial utilizando-se apenas o exame clínico pode ser incerto (BOLZAN *et al.*, 2005; RITO, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2014).

Entre os métodos de diagnóstico diferenciais empregados na oftalmologia veterinária, pode-se citar a cultura microbiológica e a citologia, os quais são de extrema importância durante o exame ocular, principalmente no cavalo por causa da predominância de enfermidades infecciosas (GILGER, 2006; LAMAGNA *et al.*, 2015), sendo assim, buscam-se técnicas que forneçam viáveis condições de avaliação, com uso de instrumentos que provoquem mínimo trauma e que diminuam as chances de danos iatrogênicos ao olho (VENÂNCIO *et al.*, 2012).

A citologia, cujo objetivo principal é identificar o processo patogênico existente através do reconhecimento e qualificação das células, independentemente da espécie, pode ser facilmente realizada pelo clínico veterinário. A avaliação é realizada em três etapas. Primeiro, identifica-se todos os possíveis tipos celulares. Segundo, procura-se evidências morfológicas do estado

funcional dessas células. Terceiro, define-se importância e quantidade das células (BRANDÃO *et al.*, 2002; GARCIA-NAVARRO, 2005).

A citologia conjuntival consiste em um importante método não invasivo que auxilia no diagnóstico e no direcionamento terapêutico das patologias oculares superficiais (BARROS *et al.*, 2001; BRANDÃO *et al.*, 2002; CAMARGO *et al.*, 2004). Segundo Dutra *et al.* (2005) e Borges *et al.* (2012), trata-se de um exame simples, rápido e de baixo custo que não deve ser dispensado, principalmente na presença de conjuntivites, abscessos e nodulações conjuntivais. De acordo com Abella *et al.* (2007) as características morfológicas das células normais presentes na conjuntiva de equinos são semelhantes aos descritos para cães e gatos.

Dos diferentes materiais que podem ser utilizados para a coleta de amostras citológicas conjuntivais citam-se: escovas, swabs de algodão, espátulas, lâminas de bisturi e papel filtro, conforme a Figura 3 (HONSHO *et al.*, 2012). A escova citológica cervical é o instrumento considerado mais adequado para coleta, pois fornece uma grande quantidade de material, formação de monocamadas dentro de um campo único e boa preservação morfológica (VENÂNCIO *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2014). Willis *et al.* (1997) afirmam que a irritação causada através da utilização da escova durante a coleta citológica é da mesma intensidade de quando comparado a técnica citológica por impressão ou no emprego de cotonetes de algodão.

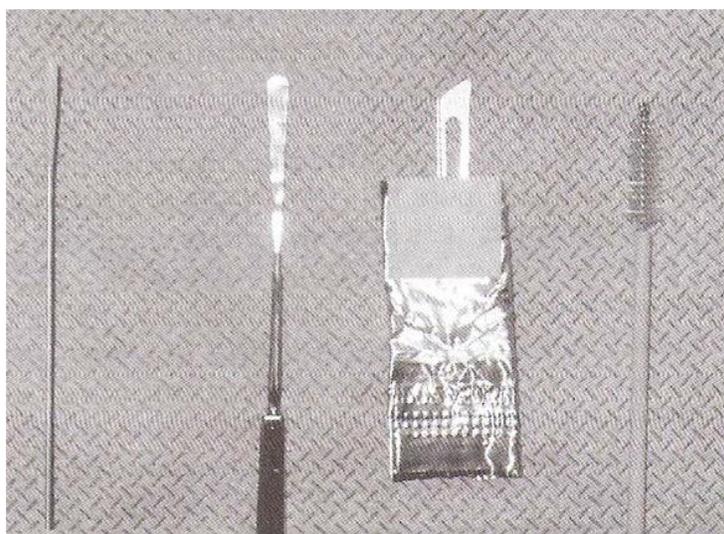


Figura 3. Diferentes instrumentos para coleta de amostra citológica conjuntival. Da esquerda para a direita: swab de algodão, espátula, lâmina de bisturi e escova de citologia. Fonte: Rito (2009).

Independentemente do tipo de coleta, observa-se que em conjuntivas normais de cavalos a camada mais profunda contém células redondas ou ovais com núcleo de coloração basofílica e pouquíssima quantidade de citoplasma. São menores quando comparadas as células das camadas superiores e são pouco encontradas no exame citológico. As células da camada intermediária apresentam um formato mais alongado e um maior citoplasma quando comparadas as células basais. As células superficiais são planas, maiores, com um pequeno núcleo de cromatina frouxa e maior quantidade de citoplasma (Figura 4). Por vezes, pequenos grânulos de melanina negros são observados no citoplasma. Células escamosas apresentam grande citoplasma e um núcleo pequeno, apresentando-se por vezes degenerado, picnótico. As células caliciformes são grandes, dilatadas, com um núcleo periférico e grandes vacúolos intracitoplasmáticos contendo muco. São encontradas em maior concentração no fórnice nasal de algumas espécies (BRANDÃO *et al.*, 2002; COWELL & TYLER, 2002; ABELLA *et al.*, 2007).

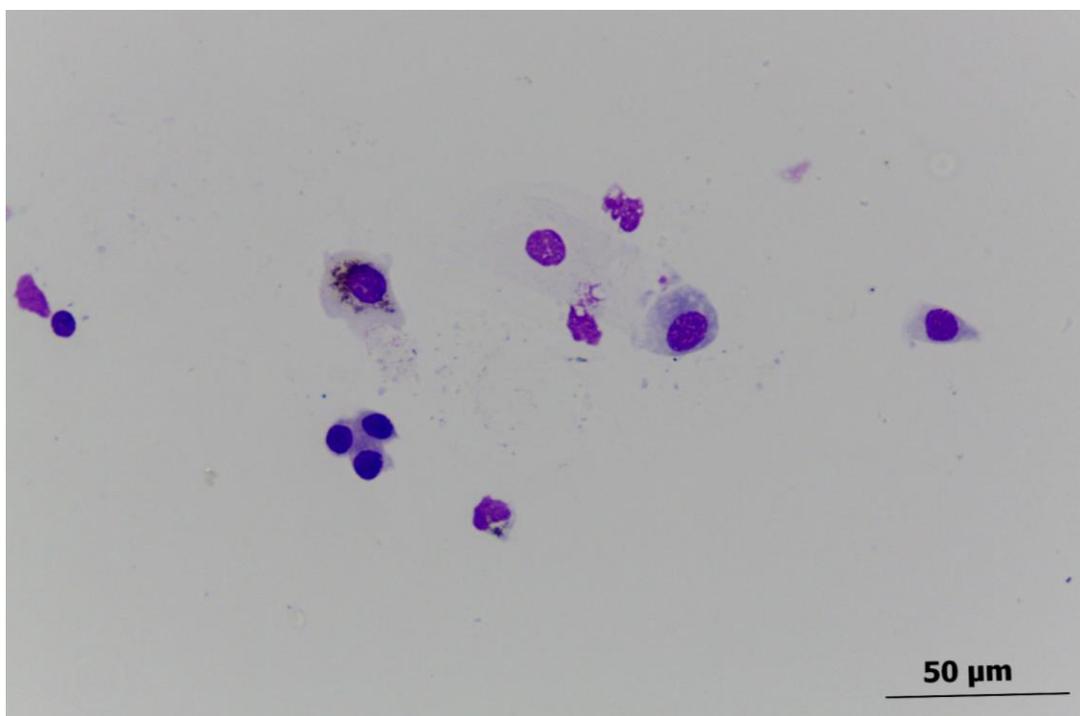


Figura 4. Microscopia óptica da citológica conjuntival esfoliativa em equinos hígdos. Observa-se diferentes tipos celulares do epitélio conjuntival. Corante Rosenfeld Fonte: LOE –UFRPE (2015).

Segundo estudos de Abella *et al.* (2007) a técnica esfoliativa em equinos hígdos revelou uma maior quantidade de células epiteliais da camada profunda (58,5%) seguida das camadas

intermediária (32,4%), superficial (2,2%), linfócitos (3,7%), células caliciformes (1,5%) e neutrófilos (0,3%). Em felinos, a técnica esfoliativa revelou células basais (6,25%), epitelial intermediária (83,90%), superficiais (9,70%) e queratinizadas (0,15%) (VENÂNCIO *et al.*, 2012).

Nas conjuntivites, o que determina o seu tipo e o grau é a predominância celular (Figura 5). Na conjuntivite aguda, associada ou não a agentes infecciosos, observa-se um aumento no número de neutrófilos e macrófagos associado a alterações degenerativas nas células epiteliais. Nos processos crônicos predominam os linfócitos. Ceratoconjuntivite seca visualiza-se um aumento das células caliciformes. Nos processos alérgicos é comum notar a presença de eosinófilos (ROCHA *et al.*, 2001; COWELL & TYLER, 2002; RASKIN & MEYER, 2003; ÇAKIR *et al.*, 2014).

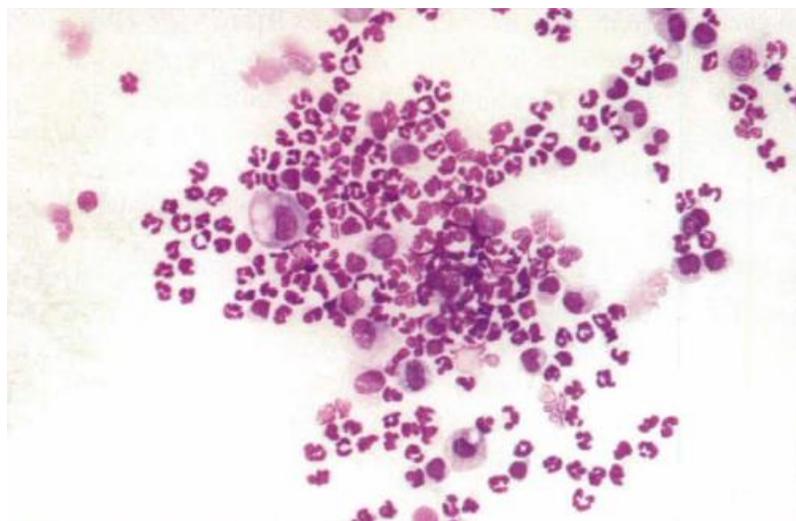


Figura 5. Lâmina citológica de um bovino com conjuntivite aguda. Observa-se a predominância de neutrófilos. Giemsa 200x. Fonte: Rocha *et al.* (2001).

Em estudos realizados por Takano *et al.* (2004), onde foi realizada a citologia conjuntival esfoliativa em pacientes humanos diagnosticados com conjuntivite fúngica e diferentes graus de lesões na córnea, foi observado que apesar de naturalmente ser visualizada pequena quantidade de neutrófilos nas conjuntivas, existe uma correlação positiva entre o grau de lesão corneana com o número de células inflamatórias conjuntivais.

2.5. Microbiota fúngica conjuntival e a Ceratomicose

O corpo humano possui 10 vezes mais células de origem não humanas do que células humanas. Estas células “não-humanas” constituem os microrganismos da microbiota comensal. Nos indivíduos saudáveis estes microrganismos são encontrados frequentemente habitando diferentes regiões do corpo (SANTOS, 2011).

Desde o seu nascimento, os animais apresentam em seu saco conjuntival grande variedade de microrganismos, tais como vírus, bactérias e fungos, que formam a microbiota ou flora conjuntival normal (PISANI *et al.*, 1997). A identificação dessa microbiota normal dos olhos permite que o clínico tenha conhecimento da presença de certos organismos na superfície do olho e, no caso de um trauma, possa dar início a um tratamento adequado (TAMARZADEH e ARAGUI – SOOREH, 2014).

Muitos fatores podem afetar a presença ou ausência da microbiota ocular. Condições edafoclimáticas, ambiente e manejo têm sido sugeridos como variáveis potenciais afetando carga microbiana em olhos de cavalos normais e doentes (ANDREW *et al.*, 2003).

A conjuntiva e a córnea têm um eficiente sistema de defesa contra infecções. Este sistema é formado por mecanismos metabólicos, imunológicos, antimicrobianos e por uma barreira física (tecido epitelial). Um desequilíbrio de qualquer um destes fatores pode submeter o olho a uma possível infecção por patógenos oportunistas, colonizando e infectando o estroma corneano (PENTLARGE, 1996; ANDREW *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2002).

De acordo com Reichmann *et al.* (2008), Thangadurai *et al.* (2010), Gilger (2012), Kulbrock *et al.* (2013) e Scantlebury *et al.* (2013), a prevalência de enfermidades oculares nos equinos pode chegar a 27%. Dentre tais doenças, a ceratomicose se destaca, pois tem sido muitas vezes diagnosticada (SOUSA *et al.*, 2011). As ceratomicoses são comuns em humanos e, dentre os animais, os equinos são os mais susceptíveis devido a conformação proeminente e lateralizada do bulbo ocular e às deficiências imunoprotetoras inatas do filme lacrimal. Outro fator que contribui é a elevada concentração de fungos no ambiente onde vivem e consequente alta concentração dos microrganismos no saco conjuntival de cavalos hígidos (FORD, 2004; MACHADO *et al.*, 2005; NARDONI *et al.*, 2007; WADA *et al.*, 2010).

Trata-se de uma infecção fúngica do estroma corneano causada principalmente por fungos comensais presentes na córnea e na conjuntiva. Essas afecções corneais são potencialmente relevantes nos equinos e, não raro, resultam na perda da visão (GALERA *et al.*, 2012; CAFARCHIA *et al.*, 2013). Estudos demonstram que cerca de 100% dos cavalos hípidos podem abrigar fungos no saco conjuntival (MACHADO *et al.*, 2005; SGORBINI *et al.*, 2008).

Mais de 30 gêneros de fungos podem causar ceratomicose nos cavalos, sendo os principais os *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium* (BLOMME *et al.*, 1998; MACHADO *et al.*, 2005; JOHNS *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2011; GALERA *et al.*, 2012). No Brasil são escassos os dados sobre a prevalência de ceratomicoses nos equídeos, no entanto, sabe-se que ela acontece e é comum, principalmente devido às condições climáticas quentes e úmidas, o que favorece o seu desenvolvimento (SOUSA *et al.*, 2011).

Os principais sinais clínicos observados são blefarospasmo, quemose, epífora, secreção purulenta, hifema e hipópio. Nas infecções mais graves a uveíte secundária, prolapso da íris e edema corneano também podem ser visualizados (CAFARCHIA *et al.*, 2013). O uso de antibióticos tópicos e a utilização inadequada de corticosteróides tópicos na terapia das úlceras de córnea podem provocar ou agravar os sinais clínicos da ceratite fúngica nos cavalos (ROSA *et al.*, 2003).

O diagnóstico baseia-se no exame físico geral, exame oftálmico, exame citológico e isolamento microbiológico. O tratamento vai depender da gravidade das lesões, sendo as intervenções tópica e cirúrgica as mais comuns, podendo ser recomendado em casos mais graves a ceratectomia (CAFARCHIA *et al.*, 2013).

3. REFERÊNCIAS

- ABELLA, N. B.; LETRON, I. R.; DIQUELOU, A.; GUILLOT, E.; REGNIER, A.; TRUMEL, C. 2007. Comparison of cytologic and histologic evaluations of the conjunctiva in the normal equine eye. American College of Veterinary Ophthalmologists, *Veterinary Ophthalmology*, v.10, p.12–18.
- ALMEIDA, F. Q.; SILVA, V. P. 2010. Progresso científico em equideocultura na 1a década do século XXI. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, S. e., p.119-129.
- ANDRADE, A. L.; STRINGHINI, G.; BONELLO, F. L.; MARINHO, M.; PERRI, S. H. V. 2002. Microbiota conjuntival de cães sadios da cidade de Araçatuba. *Arquivo Brasileiro Oftalmológico*, v.66, p.323-326.
- ANDREW, S. E.; NGUYEN, A.; JONES, G. L. 2003. Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. *Veterinary Ophthalmology*. v. 6, p.45–50.
- BARROS, J. N.; MASCARO, V. L. D. M.; GOMES, J. A. P.; FREITAS, D.; LIMA, A. L. H. 2001. Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e coloração. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v.64, n.2, p.127-131.
- BLOMME, E.; DEL PIERO, F.; LA PERLE, K. M. D.; WILKINS, P. A. 1998. Aspergillosis in horses: a review. *Equine Veterinary Education*, v.10, n.2, p.86-93.
- BOLZAN A. A.; BRUNELLI A. T.; CASTRO M. B.; SOUZA M. A.; SOUZA J. L.; LAUS J. L. 2005. Conjunctival impression cytology in dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v.8, p.401-405.
- BORGES, R. F.; CARDOSO, K. C. F.; BOLZAN, A. A.; MOMO, C.; HONSHO, C. S. 2012. Estudo comparativo de métodos de coleta e coloração para citologia conjuntival em cães normais. *Revista Brasileira de Veterinária e Zootecnia*, v. 19, n. 3, p. 381-391.
- BRANDÃO, C. V. S.; MINTO, B. W.; ROCHA, N. S.; RANZANI, J. J. T. 2002. Citologia conjuntival por impressão em gatos (*Felis domestica*). *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária*, v. 5, p.41-47.

BRANDÃO, R. R. G.; SILVA, B. C.; VALENÇA, S. R. F. A.; CAJÚ, F. M. 2010. Frequência de afecções distribuídas por aparelho dos equídeos Atendidos no hospital veterinário CESMAC. Anais do IV Simpósio da Associação Brasileira dos Médicos Veterinários de Equídeos - ABRAVEQ – NORDESTE. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.13, s. 2, p. 11.

BROOKS, D. E. 2005. **Oftalmologia para veterinários de equinos**. 1ed. São Paulo, Editora Roca. p. 7,46,47,48.

CAFARCHIA, C.; FIGUEREDO, L. A.; OTRANTO, D. 2013. Fungal diseases of horses. **Veterinary Microbiology**. v.167, n 1, p.215-234.

ÇAKIR, L.; GÜMÜŞSOY, K. S.; KUTSAL, O.; TUNÇ, A. S. 2014. Evaluation of brush cytology (cytospin technique) and cultural results in the diagnosis of keratoconjunctivitis in a goat herd. **Veterinary Journal of Ankara University**, v.61, p. 35-41.

CAMARGO, G. B.; DANTAS, M. C. N.; BARROS, J. N.; LAKE, J. C. 2004. Citologia de impressão na ceratoconjuntivite primaveril. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.67, n.6, p.877-881.

CARASTRO, S. M. 2004. Equine ocular anatomy and ophthalmic examination. **Veterinary Clinic: Equine Practice**, v. 20, p. 285–299.

COWELL, R. L.; TYLER, R. D. 2002. **Diagnostic Cytology and Hematology of the horse**. 2th ed. USA, Missouri, p. 43-51.

CUNHA, O. 2008. **Manual de oftalmologia veterinária**. Universidade Federal do Paraná. Palotina p. 2-15.

DUTRA, T. R.; RIBEIRO, D. S.; STELLING, W.; VOLINO, W.; VILAR, T. D. 2005. Auxílio da citologia esfoliativa de conjuntiva no diagnóstico de oftalmopatias em gatos *Felis catus domesticus* Linnaeus. **Revista Universidade Rural, Série Ciências**. v. 25, p.223-224.

FORD, M. M. 2004. Antifungals and their use in veterinary ophthalmology. **Vet Clin Small Anim**, v. 34 p. 669–691.

GALERA, P. D.; MARTIN, B. C.; LAUS, J. L.; BROOKS, D. 2012. Ceratomiose em equinos. **Ciência Rural**, v.42, n.7, p.1223-1230.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. 2005. **Manual de Hematologia Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Varela, p. 125-149.

GELATT, K. N. 1999. **Veterinary ophthalmology**. (3th ed.). USA: Lippincott Williams. Cap.1,2,10,18,19,29.

GILGER, B. C. 2005. **Equine Ophthalmology 1th ed. Equine ocular examination: basic and advanced diagnostic techniques**, Elsevier, Missouri, 25-27p.

GILGER, B. C. 2006. Ocular Cytology – your key to immediate ocular diagnosis. **Proceedings of the North American Veterinary Conference**, v. 20, p.7-11.

GILGER, B. C. 2012. Uveitis and Equine Recurrent Uveitis. **Proceedings of the AAEP Focus on Ophthalmology**, Raleigh, NC, USA - September p. 6-8.

GOLOUBEFF, B. **Curral projetado em bases etológicas para manejo equino**. Disponível em:<<http://abolicionismoanimal.org.br/artigos/curralprojetadoembasesetolgi casparamanejoqueino.pdf>> Acesso em: Outubro de 2015.

GONÇALVES, R. C.; PEREIRA, E. C.; MONTOYA, L. M.; PEDRAZA, F. J.; CHIACCHIO S. B.; AMORIM, R. M., BORGES, A. S., ROCHA, N. S. 2014. Contagem de células conjuntivais por citologia de impressão em bovinos e equinos. **Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária**, v.5, p.56-63.

HANGGI, E. B.; INGERSOLL, J. F. 2012. Lateral vision in horses: A behavioral investigation. **Behavioural Processes**, v.91, p.70– 76.

HONSHO, C. S.; SANTOS, F. A.; DIAS, F. G. G.; MOMO, C.; SOUZA, F. F. 2012. Avaliação comparativa de dois métodos de citologia conjuntival em felinos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.8, n.15; p.2616-2627.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. 2004. **Histologia básica**. (10ed.). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.453-466.

JOHNS, I. C.; BAXTER, K.; BOOLER, H.; HICKS, C.; MENZIES-GOW, N. 2011. Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in UK. **Veterinary Ophthalmology**, v.14, p.195–199.

KULBROCK, M.; VON BORSTEL, M.; ROHN, K.; DISTL, O.; UND OHNESORGE, B. 2013. Studie zu Häufigkeit und Schweregrad der Equinen Rezidivierenden **Uveitis bei Warmblütern**. **Pferdeheilkunde** v.29, p. 27-36.

LAMAGNA, B.; PASOLINI, M. P.; NIZZA, S.; MALLARDO, K.; FORMICOLA, M.; COSTAGLIOLA, C.; FATONE, G.; FIORITO, F.; PACIELLO, O.; MARTINO, L. 2015 Conjunctival cytological examination, bacteriological culture, and antimicrobial resistance profiles of healthy Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Southern Italy. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n.11, p.889–895.

LEITE, A. G. B.; OLIVEIRA, D.; BARALDI-ARTONI, S. M. 2013. Morfologia do sistema ocular dos animais domésticos. **Ars Veterinaria**, v.29, n.1, p.042-051.

LIMA, F. B.; ORIÁ, A. P.; MENEZES, I. D. S.; RAPOSO, A. C. S.; JUNIOR, D. C. G. 2014. Citologia esfoliativa em cães com ceratoconjuntivite seca. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.10, n.18; p.903-910.

MACHADO, M. L. S.; OLIVEIRA, L. O.; BECK, C. A. C.; CONCEIÇÃO, M. S. N.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER, D. 2005. Ceratomicose equina causada por *Aspergillus flavus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.219-223.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **EQUIDEOS**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em Dezembro de 2015.

NARDONI, S.; SGORBINI, M.; BARSOTTI, G.; CORAZZA, M.; MANCIANTI, F. 2007. Conjunctival fungal flora in healthy donkeys. **Veterinary Ophthalmology**. v.10, p.207-210.

OLIVEIRA, L. C. 2014. **A atividade equestre no Brasil: movimentação econômica e tributação incidente.** In: Âmbito Jurídico, Rio Grande, XVII, n. 121. Disponível em: <http://ambito-juridico.com.br/site/?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=14268>. Acesso em Novembro de 2015.

PENTLARGE, V. W. 1996. **Doenças oftálmicas externas e glaucoma** In: Lorenz, M.D.; Cornelius, L.M.; Ferguson, D.C. Terapêutica clínica em pequenos animais. Interlivros, cap 14, p. 287-337.

PICK, D. F.; LOVELL, G.; BROWN, S.; DAIL, D. 1994. Equine color perception revisited. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 42, p. 61-65.

PISANI, E. H. R.; BARROS, P. S. M.; AVILA, F. A. 1997. Microbiota conjuntival normal de equinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 261-265.

RASKIN R. E., MEYER D. J. 2003. **Atlas de citologia de cães e gatos.** São Paulo: Roca. Cap.1,2,14.

REICHMANN, P.; DEARO, C. O.; RODRIGUES, T. C. 2008. Ocorrência de doenças oftalmológicas em equinos utilizados para tração urbana na cidade de Londrina, PR. **Ciência Rural**, v.38, n.9, p.2525-2528.

RICCIARDI, A. R.; VILHENA, B. P.; NETO, F. A. G. S.; SPERS, E. E.; CHINI, J. 2014. Associações de interesse privado no setor de equinos em São Paulo: o caso da ABQM. **Desafio Online**, Campo Grande, v. 2, n. 3.

RITO I. Q. S. 2009. **Utilização da citologia conjuntival no diagnóstico de doenças oculares.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

ROCHA, N. S.; BURINI, C. H. P.; LIMA, L. S. A.; GONÇALVES, R. C., THOMASSIAN, A., KAMEGASAWA, A. 2001. Uso da citologia por impressão nas doenças oculares externas no homem, bovino e equino. **Revista de Educação Continuada em Medicina veterinária e Zootecnia**, v. 4, n. 1, p. 3-7.

ROSA, M.; CARDOZO, L. M.; PEREIRA, J. S.; BROOKS, D. E.; MARTINS, A. L. B.; FLORIDO, P. S. S.; STUSSI, J. S. P. 2003. Fungal flora of normal eyes of healthy horses from the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Ophthalmology**, Philadelphia, n. 6, 51-55.

SANTO, M. R. M. 2012. **Estudo da microbiota conjuntival bacteriana de primatas não humanos (*cebus apella e aotus azarai infulatus*) mantidos em cativeiro**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.

SANTOS, J. L.; SILVA, P. P. 2011. Fungal microbiota from ocular conjunctiva of clinically healthy horses belonging to the military police cavalry of Alagoas. **Brazilian Journal of Microbiology**. n. 42, p. 1151-1155.

SCANTLEBURY, C. E.; AKLILU, N.; REED, K.; KNOTTENBELT, D. C.; GEBREAB, F.; Pinchbeck G. L. 2013. Ocular disease in working horses in Ethiopia: a cross-sectional study. **Veterinary Record**, v.173, n.4, p. 1-6.

SEBRAE - *Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas*. 2012. **Agronegócio do cavalo traz discussões sobre segmento em Gravatá**. Disponível em: <<http://www.pe.agenciasebrae.com.br/sites/asn/uf/PE/Agroneg%C3%B3cio-do-cavalo-traz-discuss%C3%B5es-sobre-segmento-em-Gravat%C3%A1>> Acesso em: Dezembro de 2015.

SGORBINI, M., BARSOTTI, G., NARDONI, S., MANCIANTI, F., ROSSI, S., CORAZZA, M. 2008. Fungal Flora of Normal Eyes in Healthy Newborn Foals Living in the Same Stud Farm in Italy. **Journal of Equine Veterinary Sciences**, v.28, p.540-543.

SLATTER, D. H. 2005. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, p. 686.

SOUSA, A. 2008 **Origem e evolução do cavalo**. **Mundo dos animais**.v.6, p.20-33. Disponível em: <<http://www.mundodosanimais.pt/animais-de-quinta/origem-evolucao-cavalo/>> Acesso em Novembro de 2015.

SOUSA, M. E.; ARAÚJO, M. A. S.; MOTA, R. A.; PORTO, W. J. N.; SOUZA, A. K. P.; SANTOS, J. L.; SILVA, P. P. 2011. Fungal microbiota from ocular conjunctiva of clinically

healthy horses belonging to the military police cavalry of Alagoas. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42, p.1151-1155.

SPAAS, J.; HELSEN, W. F.; ADRIAENSSENS, M.; BROECKX, S.; DUCHATEAU, L.; SPAAS, J. H. 2014. Correlation between dichromatic color vision and jumping performance in horses. **The Veterinary Journal**, v. 202, p. 166–171.

TAKANO, Y.; FUKAGAWA, K.; DOGRU, M.; ASANO-KATO, N.; TSUBOTA, K.; FUJISHIMA, H. 2004. Inflammatory cells in brush cytology samples correlate with the severity of corneal lesions in atopic keratoconjunctivitis. **Brazilian Journal of Ophthalmology**. v. 88, p. 1504–1505.

TAMARZADEH, A., ARAGHI-SOOREH, A. 2014. Bacterial flora of the conjunctiva in healthy mules (*Equus mulus*). **The Revue de Medecine Veterinaire**, v.165, n.11-12, p.334-337.

THANGADURAI, R.; SHARMA, S.; BALI, D.; RANA B. P.; MAHAJAN, V.; SAMANTA, I.; HAZRA, S. 2010. Prevalence of Ocular Disorders in an Indian Population of Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.30, n.6, p.326-329.

VENANCIO, S. A. S.; VIEIRA, A. B.; ALENCAR, N. X.; SOARES, A. M. B. 2012. Avaliação da técnica de esfoliação com escova citológica para coleta de células conjuntivais em gatos saudáveis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.11, p.1199-1204.

VIEIRA, E. R.; REZENDE, A. S. C.; LANAI, A. M. Q.; BARCELOS, K. M. C.; SANTIAGO, J. M.; LAGE, J.; FONSECA, M. G.; BERGMANN, J. A. G. 2015. Caracterização da equideocultura no estado de Minas Gerais. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.1, p.319-323.

WADA, S.; HOBBO, S.; NIWA, H. 2010. Ulcerative keratitis in thoroughbred racehorses in Japan from 1997 to 2008. **Veterinary Ophthalmology**. n. 13, 99–105.

WILLIS, M.; BOUNOUS, D. I.; HIRSH, S.; STILES, R.K.J.S.; MARTIN, C.; RAKICH, P.; ROBERTS, W. 1997. Conjunctival brush cytology: evaluation of a new cytological collection technique in dogs and cats with a comparison to conjunctival scraping. **Veterinary & Comparative Ophthalmology**, v.7, p.74-81.

ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M.; FERREIRA, D. J.; CECON, P. R. 2006. Hábito de pastejo de eqüinos em pastagens tropicais de diferentes estruturas. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 9, n. 1, p.83-89.

4. ARTIGO I

CITOLOGIA E MICROBIOTA CONJUNTIVAL FÚNGICA DE ÉGUAS HÍGIDAS DA ZONA DA MATA E AGRESTE PERNAMBUCANOS

CYTOLOGY AND FUNGICAL CONJUNCTIVAL MICROBIOTA OF HEALTHY MARES FROM PERNAMBUCO FOREST ZONE AND AGRESTE AREA

Helio L. S. Vasco Neto¹, Fabrício B. Sá^{2*}

RESUMO

Os cavalos, entre as espécies animais, são os mais predispostos a desenvolver a ceratite fúngica, principalmente devido a conformação proeminente do globo ocular e ao grande número de microrganismos existentes no ambiente. Mais de 30 gêneros de fungos podem causar ceratomicose nos cavalos, sendo os *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium* os principais. O presente trabalho teve como objetivos isolar e identificar sazonalmente os microrganismos fúngicos localizados na conjuntiva ocular de éguas da raça Quarto de Milha, saudáveis, submetidas aos tipos de manejo extensivo e intensivo, provenientes da zona da mata e agreste pernambucanos, realizar avaliação citológica da conjuntiva ocular das éguas submetidas ao exame microbiológico, comparar os achados entre as estações do ano e os tipos de manejo submetidos e relacionar a quantidade e tipos celulares com a presença de fungos. Para tal, avaliou-se a microbiota fúngica e os aspectos celulares da mucosa do saco conjuntival do olho direito de 64 éguas da raça quarto de milha, provenientes de propriedades oriundas da Zona da Mata e Agreste Pernambucanos. Anteriormente as coletas, os animais foram submetidos ao exame clínico geral e oftálmico de rotina. Para a identificação microbiológica foram coletadas amostras utilizando um Swab seco estéril, as quais foram semeadas em meio de cultura contendo agar Sabouraud com cloranfenicol. De todas as amostras analisadas 36 (56,25%) foram positivas para presença de fungos. Deste total, 47,5% apresentaram fungos do gênero *Aspergillus*, 10% *Fusarium*, 10% *Penicillium*, 10% *Curvularia*, 10% *Alternaria*, 7,5% *Rhizopus*, e 5,0% *Mucor*. A citologia conjuntival revelou um predomínio das células epiteliais, contendo um maior número de células da camada intermediária (80,61%) não apresentando citologia inflamatória, podendo-se

afirmar que os fungos encontrados fazem parte da microbiota dos animais estudados. Conclui-se que as características climáticas do inverno pernambucano proporcionam melhores condições para o desenvolvimento fúngico conjuntival em equinos hígdos, independente do tipo de manejo, e que o número e tipo de células do saco conjuntival não são influenciados pelas condições climáticas, tipo de manejo e regiões. Pode-se concluir também que a presença fúngica não interfere no número e nos tipos de células da conjuntiva.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Oftalmologia, cavalos, micobiota, ceratomicose, citologia conjuntival.*

ABSTRACT

The horses, among animal species are more likely to develop keratitis, mainly due prominent conformation of the eyeball and the large number of microorganisms existing in the environment. More than 30 genera of fungi can cause Keratomycosis in horses, being the main ones the *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, and *Fusarium*. This study aimed to isolate and seasonally (summer and winter) identify fungal microorganisms located in the ocular conjunctiva of healthy Quarter Horse mares, under different types of management (extensive and intensive), from Pernambuco Forest Zone and Agreste area, to conduct cytological assessment of mares ocular conjunctival submitted to microbiological examination, to compare the findings between the seasons and the types of subjected management, and to relate the quantity and cell types with the presence of fungi. To this end, it was evaluated the fungal microbiota and cellular aspects of the surface layer of the conjunctival sac of the right eye of 64 Quarter Horse mares, all derived from the properties of Pernambuco Forest Zone and Agreste Area. The animals were submitted to general and ophthalmic clinic examination before the sampling. To the microbiological identification, the samples were collected using a dry sterile swab, which was rolled in a culture medium containing Sabouraud agar with chloramphenicol. Of all analyzed samples, 36 (56.25%) were positive for the presence of fungi. Of this total, 47,5% were positive for the presence of fungi of the *Aspergillus* genus, 10% *Fusarium*, 10% *Penicillium*, 10% *Curvularia*, 10% *Alternaria*, 7,5% *Rizopus* and 5.0% *Mucor*. The conjunctival cytology revealed a predominance of epithelial cells containing a greater number of cells of the intermediate layer (80.61%). It can be concluded that the climatic characteristics of Pernambuco winter provide better conditions for fungal conjunctival development in healthy horses regardless the

management type, and that the number and type of conjunctival sac cells are not affected by weather conditions, management type and regions. It can also be conclude that fungal presence does not interfere in the number and types of conjunctival cells.

INDEX TERMS: *Ophthalmology, horses, microbiota, keratomycosis, conjunctival citology.*

INTRODUÇÃO

O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo e o primeiro da América Latina, onde somados aos muares e asininos aproxima-se dos 8 milhões de cabeças, movimentando cerca de R\$ 7,3 bilhões anuais. Mais de 30 segmentos, distribuídos entre insumos, criação e destinação final, compõem a base desse mercado, que é chamado “Complexo do Agronegócio do Cavalo”, sendo responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2014).

O olho, órgão da visão, é formado pelo globo ocular e várias estruturas anexas, tais como músculos, aparelho lacrimal, pálpebras, conjuntiva, cristalino, humor aquoso e humor vítreo. A conjuntiva é uma delgada membrana mucosa, transparente, móvel e ricamente vascularizada que recobre toda superfície interna das pálpebras (conjuntiva palpebral), a esclera (conjuntiva bulbar) e toda a terceira pálpebra. O espaço formado entre a conjuntiva palpebral e bulbar é chamada de saco conjuntival (SANTO, 2012).

Desde o seu nascimento, o animal apresenta em seu saco conjuntival grande variedade de microrganismos, tais como vírus, bactérias e fungos, os quais formam a microbiota ou flora conjuntival normal (PISANI, 1997). Muitos fatores podem afetar a presença ou ausência da microbiota ocular. Condições edafoclimáticas, ambiente e manejo têm sido sugeridos como variáveis potenciais, afetando carga microbiana em olhos de cavalo normais e doentes (ANDREW *et al.*, 2003).

Fungos são frequentemente encontrados fazendo parte da microbiota conjuntival de várias espécies. Entre elas, estudos mostram que os equídeos apresentam uma maior prevalência (73% a 95%). Essa susceptibilidade pode ser explicada devido a constante exposição a organismos fúngicos existentes no ambiente e alimentos (SAMUELSON *et al.*, 1984; ANDREW *et al.*, 1998;

ROSA *et al.*, 2003; ANDREW *et al.*, 2003; FORD, 2004; MACHADO *et al.*, 2005; NARDONI *et al.*, 2007; SGORBINI *et al.*, 2008; WADA *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2011).

A conjuntiva e a córnea têm um eficiente sistema de defesa contra infecções, formado por mecanismos metabólicos, imunológicos, antimicrobianos e por uma barreira física (tecido epitelial). Um desequilíbrio de qualquer um destes fatores pode submeter o olho a uma possível infecção por patógenos oportunistas, colonizando e infectando o estroma corneano e/ou tecido conjuntival (ANDRADE *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2011).

De acordo com, Reichmann *et al.* (2008), Thangadurai *et al.* (2010), Gilger (2012), Kulbrock *et al.* (2013) e Scantlebury *et al.* (2013), a prevalência de enfermidades oculares nos equinos pode chegar a 27%. Dentre tais doenças, a ceratite fúngica se destaca devido a conformação proeminente e lateralizada do bulbo ocular e às deficiências imunoprotetoras inatas do filme lacrimal que predispõe seu surgimento.

Mais de 30 gêneros de fungos causam ceratomicose nos cavalos, sendo os *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium* os principais (BLOMME *et al.*, 1998; MACHADO *et al.*, 2005; JOHNS *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2011; GALERA *et al.*, 2012). No Brasil são escassos os dados sobre a prevalência da ceratite fúngica nos equídeos, mas sabe-se que ela acontece em grande número, principalmente devido às condições climáticas brasileira que favorecem o seu desenvolvimento (SOUSA *et al.*, 2011).

O diagnóstico baseia-se no exame físico, oftalmológico, citológico e isolamento microbiológico. O tratamento vai depender da gravidade das lesões, sendo a intervenção tópica a mais comum, podendo ser recomendado em casos mais graves a ceratectomia (CAFARCHIA *et al.*, 2013).

A citologia conjuntival consiste em um importante método não invasivo que auxilia no diagnóstico e no direcionamento terapêutico das patologias oculares superficiais (BARROS *et al.*, 2001; BRANDÃO *et al.*, 2002; CAMARGO *et al.*, 2004). Segundo Dutra *et al.*, (2005) e Borges *et al.*, (2012), trata-se de um exame simples, rápido e de baixo custo que não deve ser dispensado, principalmente na presença de conjuntivites, abscessos e nodulações conjuntivais.

O presente trabalho teve como objetivos isolar e identificar sazonalmente os microrganismos fúngicos localizados na conjuntiva ocular de éguas da raça Quarto de Milha, saudáveis, submetidas aos tipos de manejo extensivo e intensivo, provenientes da zona da mata e agreste pernambucano, realizar avaliação citológica da conjuntiva ocular das éguas submetidas ao exame microbiológico, comparar os achados entre as estações do ano e os tipos de manejo submetidos e relacionar a quantidade e tipos celulares com a presença de fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Brasil, sob o protocolo de licença 066/15. O experimento foi organizado em arranjo fatorial 2x2x2, sendo duas regiões (Zona da Mata e Agreste), duas estações climáticas (Inverno e Verão) e dois sistemas de criação (Intensivo e Extensivo).

Amostras

Para o presente trabalho foram coletadas amostras do saco conjuntival do olho direito de 64 éguas da raça quarto de milha, sendo 32 provenientes de propriedades oriundas da Zona da Mata e 32 do Agreste Pernambucano. A idade variou entre 3 a 26 anos (idade média de 9.7 anos). As coletas foram realizadas em animais igualmente distribuídos em relação ao período, de 21 de dezembro a 20 de março (verão) e de 20 de junho a 22 de agosto (inverno), e ao tipo de manejo submetidos (intensivo e extensivo). Dados climatológicos para os referidos períodos foram utilizados de acordo com APAC – PE (Tabela 1).

Tabela 1. Temperatura e umidade média da Zona da mata e Agreste Pernambucano nas estações de inverno e verão durante a realização das coletas (Fonte: APAC, 2015).

Regiões		Estações	
		Inverno	Verão
Zona da Mata	T:	24°C	27°C
	U:	83%	76%
Agreste	T:	20°C	24°C
	U:	81%	73%

Temperatura (T) e Umidade relativa do ar (%).

Coleta de Material

Após contenção física, todos os animais foram submetidos ao exame clínico geral e oftálmico de rotina (exame do segmento anterior, reflexos pupilares, teste de ameaça, ofuscamento, oftalmoscopia direta e indireta) e posteriormente foram coletadas duas amostras do saco conjuntival do olho direito de cada animal.

A primeira coleta foi realizada utilizando um swab de algodão estéril seco (Absorve®, Swab em tubo sem meio de cultura), que foi posicionado suavemente contra o saco conjuntival e cuidadosamente rodado, com total atenção para não fazer contato com a pele, cílios e pálpebras do animal. Os swabs foram, imediatamente após a coleta, imersos em tubos de ensaio contendo 2 mL de caldo glicosado, rotulados, armazenados a temperatura ambiente e enviados para processamento laboratorial.

Para a segunda coleta, realizada imediatamente após a primeira, foram previamente instiladas algumas gotas de colírio anestésico a base de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestal-con®, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda) no saco conjuntival e após alguns segundos (com dessensibilização da região) foi coletado material utilizando uma escova citológica cervical (Escova cervical modelo regular estéril, Kolplast Cia Ltda) em um movimento rotatório completo sobre a conjuntiva. Em seguida, o conteúdo coletado foi transferido para superfície de uma lâmina de vidro (Invicta, Barrio Cia Ltda), por movimentos em sentido contrário, e posteriormente, identificados, armazenado em tubos porta lâminas, lacrados e enviados para processamento laboratorial.

Processamento microbiológico - isolamento e identificação

Para o isolamento e identificação dos fungos, no laboratório de micologia médica e veterinária do departamento de micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), inicialmente foi realizado o exame direto, com a finalidade de identificar estruturas características dos fungos em geral: hifas, pseudohifas, blastomídios, astromídios e filamentos. Em seguida, as amostras foram semeadas sobre a superfície de placas de Petri contendo Ágar Sabouraud com clorafenicol a uma concentração de 50 mg/L, posteriormente enumeradas e incubadas durante 21 dias a uma temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$. No quinto dia após a incubação, para as amostras que já

apresentavam formação de colônias, foi realizada uma classificação inicial pela análise morfológica das colônias, separando-as segundo apresentação de hifas, parte germinativa e conídios, para identificação de filamentosos e leveduras. As colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud com cloranfenicol (50 mg/L) e mantidas à temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias para posterior identificação. A identificação ocorreu através da avaliação das macro e micro características morfológicas, de acordo com a metodologia utilizada por Lacaz *et al.* (2002). As amostras foram qualitativamente divididas em gêneros. Após 21 dias, não havendo crescimento fúngico, as amostras foram consideradas negativas.

Processamento citológico - coloração e montagem

No Laboratório de Oftalmologia Experimental (LOE) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) as lâminas foram fixadas durante 1 minuto em Álcool Metílico P.A. e coradas pelo método de Rosenfeld (Metanol, Giemsa, May-Greunwald), utilizando a mesma metodologia descrita por Almeida Neto (2003). Após secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram mergulhadas em solução contendo xilol por 3 segundos e ainda úmidas montadas com resina sintética (Entellan - Merck) e cobertas com uma lamínula de vidro (Invicta, Barrio Cia Ltda).

Avaliação Citológica

As lâminas foram avaliadas por meio de microscopia óptica direta (Microscópio óptico Olympus Bx41 – Olympus Optical Co., LTDA - Japan), utilizando as objetivas de 10x, 40x e 100x. Realizou-se a leitura das amostras seguindo a metodologia descrita por Almeida Neto (2003), onde dez campos foram percorridos, dois em cada faixa de microscopia, em Zig-Zag, contando dez células em cada campo até a somatória de um total de cem células integras. Foram analisados os tipos celulares, os aspectos morfológicos e a quantidade das seguintes células: células epiteliais, polimorfonucleadas, mononucleadas, eritrócitos e células caliciformes, presença de grânulos de melanina e coloração celular.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para as amostras que possuíam uma distribuição normal o teste utilizado foi ANOVA one-way e para as

de distribuição não normais foi utilizado o teste Kruskal-wallis, onde foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Do total das amostras analisadas, 36 (56,25%) foram positivas para presença de fungos. Deste total, 40 isolados foram obtidos dos quais 45,0% apresentaram fungos do gênero *Aspergillus sp* (Tabela 1), 04 amostras apresentaram crescimento associado de dois diferentes gêneros. Os resultados das amostras coletadas estão expressos nas tabelas 2, 3 e 4, onde observa-se os gêneros dos fungos isolados na Zona da Mata e Agreste, durante o inverno e verão e nos diferentes tipos de manejo.

Tabela 2. Fungos isolados das conjuntivas de cavalos oriundos da Zona da Mata e Agreste Pernambucano, submetidos ao manejo extensivo e intenso durante os períodos de inverno e verão.

Fungo	Amostras Conjuntivais (+)	% dos positivos ¹
<i>Aspergillus sp</i>	19	47,50
<i>Fusarium sp</i>	4	10,00
<i>Penicillium sp</i>	4	10,00
<i>Curvularia sp</i>	4	10,00
<i>Mucor sp</i>	2	5,00
<i>Alternaria sp</i>	4	10,00
<i>Rhizopus sp</i>	3	7,50

¹. Percentual do total de amostras positivas para fungos.

Tabela 3. Fungos isolados das amostras oriundas da Zona da Mata – PE, de animais submetidos ao manejo intensivo e extensivo no período do inverno e verão.

Fungo	Inverno		Verão	
	Intensivo	Extensivo	Intensivo	Extensivo
<i>Aspergillus sp</i>	3	1	2	2
<i>Fusarium sp</i>	1	-	1	1
<i>Penicillium sp</i>	1	1	-	1
<i>Curvularia sp</i>	1	-	2	-
<i>Mucor sp</i>	-	-	1	-
<i>Alternaria sp</i>	1	1	-	1
<i>Rhizopus sp</i>	-	2	-	-

Tabela 4. Fungos isolados das amostras oriundas do Agreste – PE, de animais submetidos ao manejo intensivo e extensivo no período do inverno e verão.

Fungo	Inverno		Verão	
	Intensivo	Extensivo	Intensivo	Extensivo
<i>Aspergillus sp</i>	4	5	1	1
<i>Fusarium sp</i>	-	-	1	-
<i>Penicillium sp</i>	-	1	-	-
<i>Curvularia sp</i>	-	-	1	-
<i>Mucor sp</i>	-	-	-	1
<i>Alternaria sp</i>	-	-	-	1
<i>Rizopus sp</i>	1	-	-	-

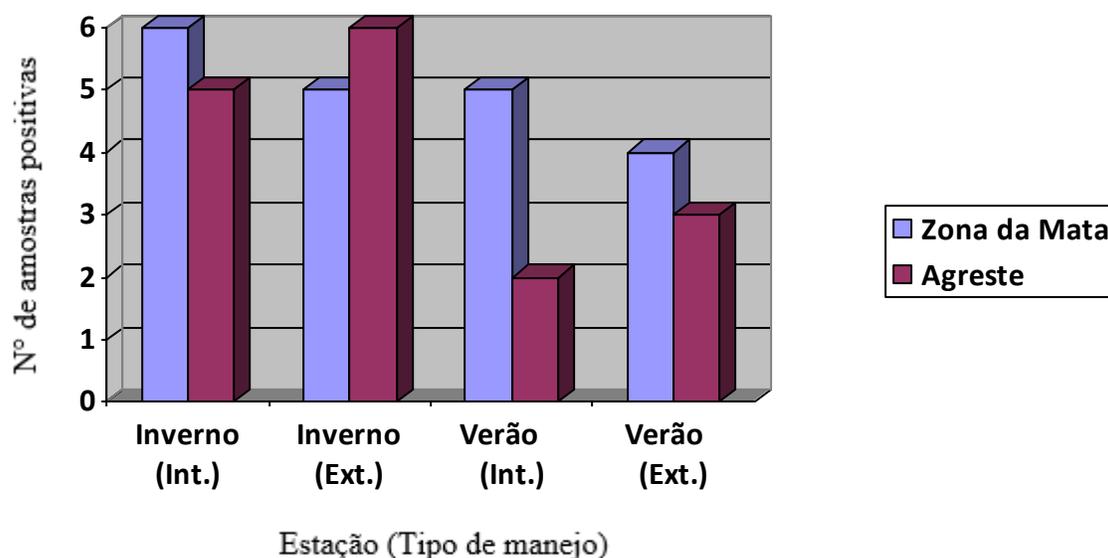


Figura 1. Número de amostras positivas para a presença de fungos no saco conjuntival em éguas da raça Quarto de Milha saudáveis de diferentes regiões e submetidas a distintos tipos de manejo e estações climáticas. Int. (Intensivo) e Ext. (Extensivo).

A idade dos animais utilizados nesse estudo variou entre 3 a 26 anos, apresentando uma média de 9.7 anos. Cerca de 66,67% de todos os animais positivos para fungos apresentavam idade inferior à idade média.

Na avaliação citológica, foi observado a presença de células epiteliais em todas as lâminas analisadas. Houve uma predominância de células da camada intermediária, seguida da camada

superficial e basal. Em poucas lâminas foram encontrados neutrófilos e linfócitos (Figura 2). Eosinófilos e eritrócitos não foram visualizados (Tabela 5).

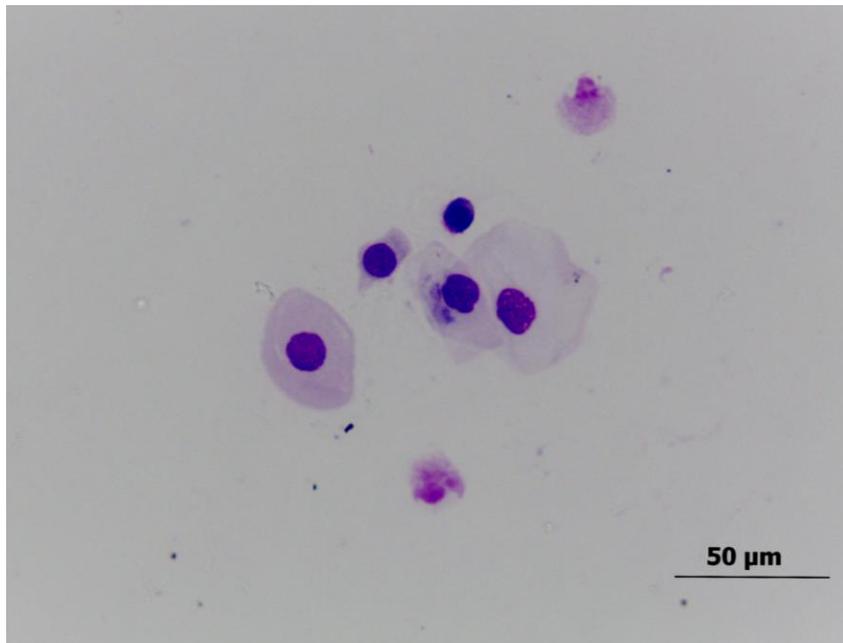


Figura 2. Microscopia óptica da citológica conjuntival, pelo método esfoliativo, em equinos hípidos. Diferentes tipos celulares do epitélio conjuntival, corante Rosenfeld. Fonte: LOE – UFRPE (2015).

Tabela 5. Número de células conjuntivais coletadas no inverno e verão do olho direito de 64 éguas saudáveis, oriundas da Zona da Mata e Agreste Pernambucano.

	Células	Inverno		Verão		Total	
		No	%	No	%	No	%
Epiteliais:	Profunda (Basal)	296	52,76	265	47,24	561	8,77
	Intermediária	2555	49,53	2604	50,47	5159	80,61
	Superficial	302	51,89	280	48,11	582	9,09
	Escamosa (Queratinizada)	30	44,12	38	55,88	68	1,06
Leucócitos:	Neutrófilo	10	62,5	06	37,5	16	0,25
	Linfócito	06	60	04	40	10	0,16
	Eosinófilo	0	0	0	0	0	0
Cel. Caliciformes		01	25	03	75	04	0,06
Eritrócitos		0	0	0	0	0	0

Número total (No) e Percentual de células (%).

DISCUSSÃO

A prevalência de fungos nesse estudo foi de 56,25%, inferior aos dados reportados para cavalos em alguns trabalhos (ANDREW *et al.*, 2003; ROSA *et al.*, 2003; JOHNS *et al.*, 2011; VOELTER-RATSON *et al.*, 2013). Esse valor pode ser explicado devido ao fato da coleta ter sido realizada apenas no saco conjuntival direito. Entretanto, se considerarmos apenas o valor encontrado em uma amostra, ou seja, apenas um olho, o valor para amostras positivas não diferiu dos resultados encontrados por Sousa *et al.* (2011), que analisando amostras coletadas do saco conjuntival direito de cavalos da cavalaria da polícia militar do estado de Alagoas, observaram que 56% das amostras apresentaram crescimento fúngico.

Como pode ser observado na Tabela 2, 3 e 4, os principais gêneros isolados foram *Aspergillus sp* (45%), *Penicillium sp* (10%), *Fusarium sp* (10%), *Alternaria* (10%) e *Curvularia sp* (10%). Corroborando com os achados de Sousa *et al.* (2011) e Rosa *et al.* (2003), que também encontraram maior predominância de fungos do gênero *Aspergillus*, e diferindo dos achados de Andrew *et al.* (2003) que, apesar de observarem presença deste gênero, a maior predominância foi do *Crisosporium sp.*, seguido do *Cladosporium sp.* Essa diferença entre os achados pode ser explicada devido ao fato dos gêneros de fungos isolados da conjuntiva de equinos hígdos poderem variar de acordo com os fatores ambientais, localização geográfica, tipo de manejo, idade e sexo (SAMUELSON *et al.*, 1984).

Não foi observada diferença significativa no número de amostras positivas para os tipos de manejo intensivo e extensivo. Resultados semelhantes em bovinos foram encontrados por Sgorbini *et al.* (2010), enquanto que Pisani *et al.* (1997) mostraram que houve diferença entre os tipos de manejo em equinos. No entanto, foi observada diferença significativa entre as estações climáticas, apresentando crescimento fúngico em 68,75% das amostras coletadas no inverno e 43,75% das amostras coletadas no verão (Figura 1), corroborando com os estudos realizados no Brasil por Pisani *et al.* (1997) e nos EUA por Moore *et al.* (1988), onde mostraram que a microbiota conjuntival normal de equinos também variou em relação às estações. Estes achados diferem dos encontrados por Andrew *et al.* (2003) avaliando éguas no estado da Flórida, os quais observaram que não houve diferença na prevalência de fungos conjuntivais entre as estações climáticas.

A afirmativa de Akinyele *et al.* (2005), de que o crescimento de fungos filamentosos é diretamente influenciado por uma variedade de fatores ambientais, reforça os achados do presente estudo. Segundo Dantigny *et al.* (2005), a temperatura e umidade, por exemplo, são as mais importantes variáveis para determinar a habilidade dos fungos crescerem. Diante dos valores apresentados para temperatura e umidade relativa nas diferentes estações climáticas e regiões (Tabela 1), pode ser observado que a maior umidade relativa e uma menor temperatura foram mais favoráveis para o crescimento fúngico, uma vez que o inverno apresentou maior número de amostras positivas em comparação ao verão (Figura 1). Os achados do presente estudo estão dentro da faixa encontrada por Gock *et al.* (2003), que observaram que a temperatura e umidade ótimas para a germinação da maioria dos fungos é de 25 a 37° C e 82 a 92%, respectivamente.

A idade média dos animais utilizados nesse estudo foi de 9,7 anos. Cerca de 66,67% das amostras positivas foram coletas de éguas que apresentavam idade inferior à média. Dados semelhantes foram encontrados por Andrew *et al.* (2003), onde afirmam que os animais mais jovens tiveram uma maior incidência de isolados que os animais mais velhos. Esses autores acreditam que esse aumento pode ser devido à variabilidade nos mecanismos de defesa da superfície ocular dos animais mais jovens.

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) quanto a presença de células epiteliais e/ou polimorfonucleares e mononucleares entre os animais. Na citologia conjuntival, puderam ser observadas células epiteliais da camada profunda (8,77%), células da camada intermediária (80,61%), células da camada superficial (9,09%), células escamosas (1,06%), linfócitos (0,16%), células caliciformes (0,16%) e neutrófilos (0,25%), como pode ser observado na Tabela 5. Trabalhos utilizando a mesma metodologia em equinos são escassos, e algumas vezes apresentam particularidades metodológicas que fazem com que os dados sejam diferentes dos encontrados no presente trabalho, como é o caso dos achados de Abella *et al.* (2007) estudando equinos hípidos, que, apesar de semelhante metodologia, não consideraram células escamosas. Estes autores encontraram uma quantidade superior de células epiteliais da camada profunda (58,5%), seguida das camadas intermediária (32,4%), linfócitos (3,7%), superficial (2,2%), células caliciformes (1,5%) e neutrófilos (0,3%).

Mesmo com proporções celulares diferentes, tanto os achados do presente estudo quanto os achados de Abella *et al.* (2003) não apresentaram alterações condizentes a um processo inflamatório/infeccioso, o qual é caracterizado pela predominância do tipo celular, sendo observada na conjuntivite aguda uma predominância de neutrófilos e macrófagos associados a alterações degenerativas das células (ROCHA *et al.*, 2001; COWELL & TYLER, 2002; RASKIN & MEYER, 2003; ÇAKIR *et al.*, 2014).

A ausência de alterações oftálmicas (blefarospasmo, epífora e quemose), associada aos achados citológicos caracterizam ausência de um processo inflamatório/infeccioso, o que comprova que os fungos presentes na conjuntiva ocular de equinos hígdos se comportam como parte integrante da microbiota comensal, não causando patologias se o epitélio da conjuntiva e córnea estiverem intactos. No entanto, quando uma lesão epitelial ocorre, os fungos podem infiltrar-se no estroma corneal resultando em uma ceratite fúngica (ANDREW *et al.*, 2003; VOELTER-RATSON *et al.*, 2013).

CONCLUSÃO

Conclui-se que as características climáticas do inverno pernambucano proporcionam melhores condições para o desenvolvimento fúngico conjuntival em equinos hígdos, independentemente do tipo de manejo empregado, e que o número e tipo de células do saco conjuntival não são influenciados pelas condições climáticas, tipo de manejo e regiões. Pode-se concluir também que essa presença fúngica não interfere no número e nos tipos de células da conjuntiva.

REFERÊNCIAS

Abella, n. B.; letron, i. R.; diquelou, a.; guillot, e.; regnier, a.; trumel, c. 2007. Comparison of cytologic and histologic evaluations of the conjunctiva in the normal equine eye. American college of veterinary ophthalmologists, *veterinary ophthalmology*, v.10, p.12–18.

Akinyele, b.j.; adetuyi, f.c. 2005. Effect of agrowastes, ph and temperature variation on the growth of volva- riella volvacea. *African journal of biotechnology*, v.4, n.12, p.1390-1395.

Almeida neto, j. B. 2003. **Estudo clínico, citológico e bacteriológico conjuntival de ovinos com ceratoconjuntivite infecciosa**. Dissertação de mestrado, universidade federal rural de pernambuco, recife, pe.

Andrade, a. l.; stringhini, g.; bonello, f. l.; marinho, m.; perri, s. h. v. 2002. Microbiota conjuntival de cães saudáveis da cidade de araçatuba. **Arquivo brasileiro oftalmológico**, v.66, p.323-326,

Andrew, s. e.; brooks, d. e.; smith, p. j.; gelatt, k. n.; chmielewski, n. t.; whittaker, c. j. g. 1998. Equine ulcerative keratomycosis: visual outcome and ocular survival in 39 cases (1987-1996). **Equine vet. J., london**, v. 30 (2), p. 109-116.

Andrew, s. e.; nguyen, a.; jones, g. L. 2003. Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in florida. **Veterinary ophthalmology**. V.6, p.45-50.

Barros j. n., mascaro v. l. d. m., gomes j. a. p., freitas d., lima a. l. h. 2001. Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e coloração. **Arquivo brasileiro oftalmológico**, v.64, n. 2, p.127-131.

Blomme, e.; del piero, f.; la perle, k. M. D.; wilkins, p. A. 1998. Aspergillosis in horses: a review. **Equine veterinary education**, v.10, n.2, p.86-93.

Borges, r.f.; cardoso k. C. F.; bolzan, a. A.; momo, c.; honsho, c. S. 2012. Estudo comparativo de métodos de coleta e coloração para citologia conjuntival em cães normais. **Revista de veterinária e zootecnia**, v. 19, n. 3, p. 381-391.

Brandão, c. V. S.; minto, b. W.; rocha, n. S.; ranzani, j. J. T. 2002. Citologia conjuntival por impressão em gatos (*felis domestica*). **Revista de educação continuada em medicina veterinária e zootecnia**, v. 5, p.41-47.

Cafarchia, c.; figueredo, l. A.; otranto, d. 2013. Fungal diseases of horses. **Veterinary microbiology**. V.167, n 1, p.215-234.

Camargo, g. B.; dantas, m. C. N.; barros, j. N., lake, j. C.; 2004. Citologia de impressão na ceratoconjuntivite primaveril. **Arquivo brasileiro oftamológico**, v.67, n.6, p.877-81.

Çakir, l.; gümüşsoy, k. S.; kutsal, o.; tunç, a. S. 2014. Evaluation of brush cytology (cytospin technique) and cultural results in the diagnosis of keratoconjunctivitis in a goat herd. **Veterinary journal of ankara university**, v. 61, p. 35-41.

Cowell, r. L.; tyler, r. D. 2002. **Diagnostic cytology and hematology of the horse**. 2th ed. Usa, missouri, p. 54.

Dutra, t. R.; ribeiro, d. S.; stelling, w.; volino, w.; vilar, t. D. 2005. Auxílio da citologia esfoliativa de conjuntiva no diagnóstico de oftalmopatias em gatos *felis catus domesticus* linnaeus. **Revista universidade rural, série ciências**. V. 25, p.223-224.

Ford, m. M. 2004. Antifungals and their use in veterinary ophthalmology. **Veterinary clinic small animal**, v. 34 p. 669–691.

Galera, p. D.; martin, b.c.; laus, j.l.; brooks, d. 2012. Ceratomicose em equinos. **Ciencia rural**, v.42, n.7, p.1223-1230.

Gilger, b. C. 2012. **Uveitis and equine recurrent uveitis. Proceedings of the AAEP focus on ophthalmology**, Raleigh, nc, usa - september 6-8.

Gock, m. A.; hocking, a. D.; pitt, j. I.; poulos, p. G. 2003. Influence of temperature, water activity and ph on growth of some xerophilic fungi. **International journal of food microbiology** v. 81, p. 11-19.

Johns, i. C.; baxter, k.; booler, h.; hicks, c.; menzies-gow, n. 2011. Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in uk. **Veterinary ophthalmology**, v.14, p.195–199.

Kulbrock, m.; von borstel, m.; rohn, k.; distl, o.; und ohnesorge, b. 2013. Studie zu häufigkeit und schweregrad der equinen rezidivierenden uveitis bei warmblütern. **Pferdeheilkunde** v. 29, p. 27-36.

Lacaz, c. S.; porto, e.; martins, j. E. C.; heins-vaccari, e. M.; melo, n. T. 2002. **Tratado de micologia médica**. 9. Ed. São paulo: sarvier, p. 1104.

Machado, m. L. S.; oliveira, l. O.; beck, c. A. C.; conceição, m. S. N.; ferreiro, l.; driemeier, d. 2005. Ceratomicose equina causada por *aspergillus flavus*. **Acta scientiae veterinariae**, porto alegre, n. 33, 219-223.

Mapa - ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Equideos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em dezembro de 2015.

Moore, c.p.; heller, n.; majors, l.; whitley, r.d.; burgess, e.c.; weber, j. (1988). Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. **Am. Journal Veterinary Res.**, chicago, v. 49 (6), p. 773-777.

Nardoni, s.; sgorbini, m.; barsotti, g.; corazza, m.; mancianti, f. 2007. Conjunctival fungal flora in healthy donkeys. **Veterinary ophthalmology**, v.10, 207-210.

Nevarez, l.; vasseur. V.; le madec, a.; les bras, m. A.; coroller, l.; lequérinel, i.; barbier, g. 2009. Physiological traits of *penicillium glabrum* strain lcp 08.5568, a filamentous fungus isolated from bottled aromatized mineral water. **International journal of food microbiology**, v. 130, n.3, p.166-171.

Pisani, e. H. R.; barros, p. S. M.; avila, f. A. 1997. Microbiota conjuntival normal de equinos. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, são paulo, v. 34, n. 5, p. 261-265.

Raskin, r. E.; meyer, d. J. 2003. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São paulo: roca. Cap.1,2,14.

Reichmann, p.; dearo, c.o.; rodrigues, t.c. 2008. Ocorrência de doenças oftalmológicas em equinos utilizados para tração urbana na cidade de londrina, pr. **Ciência rural**, v.38, n.9, p.2525-2528.

Rocha, n. S.; burini, c. H. P.; lima, l. S. A.; gonçalves, r.c.; thomassian, a.; kamegasawa, a. 2001. Uso da citologia por impressão nas doenças oculares externas no homem, bovino e equino. **Revista de educação continuada em medicina veterinária e zootecnia**, v.4, n.1, p.3-7.

Rosa, m.; cardozo, l. M.; pereira, j. S.; brooks, d. E.; martins, a. L. B.; florido, p. S. S.; stussi, j. S. P. 2003. Fungal flora of normal eyes of healthy horses from the state of rio de janeiro, brazil. **Veterinary ophthalmology**, philadelphia, v. 6, p. 51-55.

Scantlebury, c. E.; aklilu, n.; reed, k.; knottenbelt, d. C.; gebreab, f.; pinchbeck g. L. 2013. Ocular disease in working horses in ethiopia: a cross-sectional study. **Veterinary record**, v.173, n.4, p. 1-6.

Sgorbini, m.; barsotti, g.; nardoni, s. 2008 fungal flora of normal eyes in healthy newborn foals living in the same stud farm in italy. **Journal of equine veterinary science**. V. 28, p. 540–543.

Sgorbini, m.; barsotti, g.; nardoni, s.; brombin, m.; sbrana, a.; mancianti, f.; corazza, m. 2010. Seasonal prevalence of fungi in the conjunctival fornix of healthy cows during a 2-year study. **Veterinary ophthalmology**. V. 13(4), p. 227-34.

Samuelson, d.a.; andresen, t.l.; gwin, r.m. (1984). Conjunctival fungal flora in horses, cattle, dogs, and cats. **J. Am. Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 184 (10), p. 1240-1242.

Santo, m. R. M. 2012. **Estudo da microbiota conjuntival bacteriana de primatas não humanos (*cebus apella e aotus azarai infulatus*) mantidos em cativeiro**. Dissertação (mestrado em saúde e produção animal) - universidade federal rural da amazônia, belém.

Sousa, m. E.; aráújo, m. A. S.; mota, r. A.; porto, w. J. N.; souza, a. K. P.; santos, j. L.; silva, p. P. 2011. Fungal microbiota from ocular conjunctiva of clinically healthy horses belonging to the military police cavalry of alagoas. **Brazilian journal of microbiology**, v. 42. 1151-1155.

Thangadurai, r.; sharma, s.; bali, d.; rana b. P.; mahajan, v.; samanta, i.; hazra, s. 2010. Prevalence of ocular disorders in an indian population of horses. **Journal of equine veterinary science**, v.30, n.6, p.326-329.

Voelter-ratson, k.; monod, m.; unger, l.; spiess, bm.; pot, s.a. 2013. Evaluation of the conjunctival fungal flora and its susceptibility to antifungal agents in healthy horses in switzerland. **Veterinary ophthalmology**. V. 17,1, p. 31-6.

Wada, s.; hobo, s.; niwa, h. 2010. Ulcerative keratitis in thoroughbred racehorses in japan from 1997 to 2008. **Veterinary ophthalmology**. V. 13, p.99–105.

5. ANEXOS



ISSN 0100-736X *versão impressa*
ISSN 1678-5150 *versão online*

0100-736X	Pesquisa Veterinária Brasileira (Impresso)	A2	MEDICINA VETERINÁRIA	Atualizado
-----------	--	----	----------------------	------------

Apresentação de manuscritos

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma

assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Helvética, corpo 11, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de**

todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails de outros autores;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez.** A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano;** a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica.** Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão "jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.** **5. Os Quadros deverão ser** explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com "a" em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.