

TRATAMENTO COM ANTI-INFLAMATÓRIOS SOBRE A QUANTIDADE E QUALIDADE DOS *COMPLEXOS Cumulus oophorus* ASPIRADOS DOS OVÁRIOS DE NOVILHAS

Gustavo Mafra Fernandes¹
 Adalgiza Pinto Neto²
 Antônio Campanha Martinez³
 Rodrigo Fernando Santana de Lucia⁴
 Eduardo Toshihiro Roncaglia Yabushita⁴
 Rodrigo Kazuto Ishida⁴

FERNANDES, G. M.; PINTO NETO, A.; MARTINEZ, A. C.; LUCIA, R. F. S. de; YABUSHITA, E. T. R.; ISHIDA, R. K. Tratamento com anti-inflamatórios sobre a quantidade e qualidade dos complexos *Cumulus oophorus* aspirados dos ovários de novilhas. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 16, n. 1, p. 19-23, jan./jun. 2013.

RESUMO: A produção de embrião *in vitro* (PIV) associada à aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU) proporcionou um incremento na produtividade reprodutiva de fêmeas bovinas, sendo de grande importância para a multiplicação rápida desses animais. No entanto, pode ocasionar alterações morfológicas e funcionais nos ovários. Esse estudo objetiva avaliar os efeitos do tratamento com anti-inflamatórios sobre a quantidade e qualidade de *Complexos Cumulus Oophorus* (COC's) aspirados de ovários de novilhas mestiças. Para tanto, 18 novilhas foram divididas em três tratamentos: Grupo I Controle, II tratado com flunixin meglumine (1,1 mg/Kg – Banamine[®]) e III tratado com meloxicam (0,5 mg/kg – Maxicam[®]). Os animais foram submetidos a dez OPU's, sendo os COC's coletados quantificados e avaliados. O número médio de folículos a serem aspirados (imagem ultrassom) foi semelhante em todos os tratamentos ($p > 0,05$). O Grupo III apresentou menor média de COC's viáveis ($p < 0,05$), enquanto o grupo Controle e o tratado com flunixin meglumine apresentaram média de COC's viáveis semelhante ($p > 0,05$). O número médio de COC's aspirados no Grupo Controle foi $19,52 \pm 11,00$ COC's e o de COC's viáveis de $14,09 \pm 8,53$ por sessão de aspiração folicular. O número médio de ovócitos Grau I e II foi semelhante entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). No entanto, o número médio de ovócitos Grau III foi menor nos animais tratados com meloxicam ($p < 0,05$). O número de ovócitos sem *cumulus* foi semelhante entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), enquanto o número de ovócitos atrésicos apresentou diferença somente entre os grupos tratados com anti-inflamatório ($p < 0,05$), onde os animais tratados com meloxicam, apresentaram menor número médio de ovócitos atrésicos.

PALAVRAS-CHAVE: Bovino. Flunixin meglumine. Meloxicam. OPU.

TREATMENT WITH ANTI-INFLAMMATORY ON THE QUANTITY AND QUALITY OF THE *CUMULUS OOPHORUS* COMPLEXES ASPIRATED FROM THE OVARIES OF HEIFERS

ABSTRACT: The production of bovine embryo *in vitro* (PIV) associated to the ultrasound-guided transvaginal folicular aspiration (OPU - Ovum pick-up) provided an increment in the reproduction productivity of cows, being of great importance for the fast multiplication of these animals. However, it can cause morphologic and functional alterations in the ovaries. This study aims to evaluate the anti-inflammatory effects on the quantity and quality of *cumulus oophorus complexes* (COC's) aspirated from the ovaries of crossbred heifers treated with anti-inflammatory. In order to do so, 18 heifers were divided in three treatment groups, being Group I Control, II treated with Flunixin Meglumine (1.1 mg/Kg - Banamine[®]) and III treated with Meloxicam (0,5 mg/kg - Maxicam[®]). The animals were submitted to ten OPU's, being the collected oocytes quantified and evaluated. The average number of follicles to be aspirated was similar in all the treatments ($p > 0.05$). Group III showed a smaller average number of viable COC's ($p < 0.05$), whereas the Control group and the one treated with flunixin meglumine showed a similar average number of viable COC's ($p > 0.05$). In the Control Group the average number of aspirated COC's was 19.52 ± 11.00 COC's and the average number of viable COC's was 14.09 ± 8.53 per folicular aspiration session. The average number of oocytes of Degree I and II was similar among the experimental groups ($p > 0.05$). However, the average number of oocytes of Degree III was smaller in the animals treated with meloxicam ($p < 0.05$). The number of oocytes without cumulus was similar among the groups ($p > 0.05$), whereas the number of atresic oocytes showed difference among the groups treated with anti-inflammatory, where that one treated with meloxicam showed a smaller average number of atresic oocytes.

KEYWORDS: Cattle. Flunixin meglumine. Meloxicam. OPU.

¹Mestre em Ciência Animal. Universidade Paranaense - UNIPAR. Umuarama-PR. E.mail: gmfvvet@hotmail.com

²Professora do Curso de Medicina Veterinária da UFFS, Realeza-PR. E.mail: adalgiza.neto@uffrs.edu.br. Endereço: Campus UFFS-Realeza - Rua Edmundo Gaievski, 1000 - Caixa Postal 253 - CEP: 85770-000 - Realeza-PR. Autora para correspondência.

³Professor do curso de Medicina Veterinária da UEM, Umuarama-PR. E.mail: antunico@gmail.com

⁴Médicos Veterinários. Geração Tecnologia Reprodutiva Ltda- BioGer. Maringá-PR.

TRATAMIENTO CON ANTIINFLAMATORIOS EN CANTIDAD Y CALIDAD DE COMPLEJOS *Cumulus oophorus* ASPIRADOS DE OVARIOS DE NOVILLAS

RESUMEN: La producción de embrión in vitro (PIV) asociada a la aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía (OPU), ha proporcionado incremento en la productividad reproductiva de hembras bovinas, siendo de gran importancia para la multiplicación rápida de esos animales. Sin embargo, puede ocasionar alteraciones morfológicas y funcionales en los ovarios. Ese estudio objetiva evaluar los efectos del tratamiento con antiinflamatorios en cantidad y calidad de Complejos *Cumulus Oophorus* (COC's) aspirados de ovarios de novillas mestizas. Así, 18 novillas fueron divididas en tres tratamientos: Grupo I Control, II tratado con flunixinmeoglumine (1,1 mg/Kg – Banamine®) y III tratado con meloxicam (0,5 mg/kg - Maxicam®). Los animales fueron sometidos a diez OPU's, siendo los COC's colectados, cuantificados y evaluados. El número medio de folículos a ser aspirados (imagen ecográfica) fue semejante en todos los tratamientos ($p>0,05$). El grupo III presentó menor media de COC's viables ($p>0,05$), mientras el grupo Control y el tratado con flunixinmeoglumine presentaron media de COC's viables semejante ($p>0,05$). El número mediano de COC's aspirados en el Grupo Control fue $19,52 \pm 11,00$ COC's y el de COC's viables de $14,09 \pm 8,53$ por sesión de aspiración folicular. El número mediano de ovocitos Grado I y II fue semejante entre los grupos experimentales ($p>0,05$). Todavía, el número mediano de ovocitos Grado III fue menor en los animales tratados con meloxicam ($p<0,05$). El número de ovocitos sin *cumulus* fue semejante entre los grupos experimentales ($p>0,05$), mientras el número de ovocitos atrésicos presentó diferencia sólo entre los grupos tratados con antiinflamatorio ($p>0,05$), ya los animales tratados con meloxicam presentaron menor número mediano de ovocitos atrésicos.

PALABRAS CLAVE: Bovino. Flunixinmeoglumine. Meloxicam. OPU.

Introdução

Com a evolução atual da produtividade na pecuária nacional, associado às evoluções científicas e tecnológicas, várias biotecnologias ligadas à reprodução animal vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas. O uso das biotecnologias aumentam a eficiência reprodutiva, maximizando a produção de animais geneticamente superiores, com a finalidade de aprimorar material genético a fim de se obter maior número de descendentes, em menor período de tempo possível (RENESTO, 2004). A produção *in vitro* de embriões (PIV) é considerada a terceira geração de biotecnologia aplicada ao melhoramento genético e vem sendo amplamente utilizada em sistema de produção de bovinos no Brasil.

A introdução da aspiração transvaginal guiada por ultrassonografia (OPU), seguida pela produção *in vitro* de embriões (OPU-PIV), proporcionou um incremento da produtividade reprodutiva de fêmeas bovinas, sendo de grande importância para a multiplicação rápida desses animais (SENEDA et al., 2006).

Relatos sobre o impacto do procedimento de OPU na saúde da doadora e no desempenho reprodutivo são escassos (BOLS; LEROY; VIANA, 2005). Snel-Oliveira et al. (2002) trabalharam com novilhas Nelore pré-púberes e encontraram, após três sessões de aspiração folicular, fibrose capsular circunscrita, de tamanho variado na superfície ovariana que se estendeu em profundidades de 200 a 300 mm, em todos os ovários analisados. Nas cápsulas fibrosas notaram-se poucos ou nenhum, folículos primários. Já folículos terciários foram encontrados esporadicamente. Em diferentes profundidades do córtex foram encontrados folículos atrésicos, alguns corpos albicans e cicatrizes.

Viana et al. (2003) relataram que a punção folicular pode ocasionar alterações morfológicas e funcionais nos ovários, cuja significância está proporcionalmente relacionada ao número de sessões de punção ao qual as doadoras são submetidas, e ao número médio de estruturas recuperadas por sessão de coleta.

Utiliza-se o auxílio da ultrassonografia para a obtenção de ovócitos pela utilização de um sistema de biópsia por agulha, considerado pouco traumático (PIETERSE et al.,

1991), e que pode ser utilizado repetidas vezes em um mesmo animal (KRUIP et al., 1991; BONI et al., 1997), com eficiência semelhante (BECKER et al., 1996) ou, eventualmente, até maior que a da laparoscopia (SANTL et al., 1998).

Nos folículos previamente aspirados observa-se hemorragia interna e variado grau de desorganização celular das camadas da parede celular, presença de células luteais dispersas, possivelmente, causadas pela fragmentação da parede do folículo decorrente do trauma da agulha utilizada para aspiração. Sob avaliação microscópica observa-se presença de coágulo nos folículos recém-aspirados, e um grau variado de espessamento do epitélio ovariano. Nos ovários submetidos à várias aspirações esse espessamento comprometia a vascularização externa dos folículos em crescimento. Alguns folículos, previamente, aspirados apresentaram desorganização da parede celular (VIANA et al., 2003).

Diante das alterações ovarianas relatadas decorrentes da OPU, é coerente supor, que alterações nos COC's poderiam ser esperadas após sessões de aspirações foliculares, que resultariam em prejuízo para a utilização prática dessa técnica que resultaria em menor número de ovócitos recuperados, e/ou menor qualidade de ovócitos aspirados.

O uso de anti-inflamatórios não hormonais concomitante, à realização das aspirações poderia ser uma alternativa, a fim de minimizar os danos ovarianos decorrentes dos procedimentos da OPU, causados pela penetração da agulha no estroma ovariano. Esses agentes agem no processo de redução da reação inflamatória por inibirem a síntese e liberação de prostaglandinas, especialmente as do tipo E, atuando em etapas pré-estabelecidas na via do ácido araquidônico (SPINOSA, 2011).

O objetivo desse estudo é quantificar e qualificar os COC's aspirados dos ovários de novilhas mestiças submetidas à repetidas aspirações foliculares guiada por ultrassom.

Material e Métodos

Esse estudo foi realizado na Estância Locateli, localizada no município de Lupionópolis, Estado do Paraná, no período de abril a dezembro de 2010. Utilizou-se 18 novilhas, sem raça definida, com 36 (± 4) meses de idade, e escore corporal de 3,5 (escala de 1-5), que foram aleatoriamente divididas em três grupos experimentais, contendo seis animais cada.

Antes de cada OPU, o número de folículos a serem aspirados em cada ovário foi quantificado, por meio de imagem do ultrassom.

As aspirações foliculares foram realizadas uma vez por semana em metade dos animais, de modo que todos os animais foram aspirados quinzenalmente. Ao final do período experimental foram realizadas dez sessões de aspirações foliculares em todos os animais, em momentos aleatórios do ciclo estral. Para tanto, utilizou-se um ultrassom acoplado a um transdutor microconvexo, com frequência de 5,0 MHz da marca Aloka junto a uma bomba de vácuo (BOLS; LEROY; VIANA, 2005). A agulha utilizada para a punção foi a hipodérmica de calibre 18G descartável e com bisel curto.

Os animais do Grupo 1 (Controle) não receberam medicamento, enquanto os animais dos Grupos II e III foram tratados, por via intra muscular, com anti-inflamatórios flunixin meglumine (1,1 mg/Kg - Banamine®) e meloxicam (0,5 mg/Kg - Maxicam®), respectivamente, após cada sessão de aspiração folicular.

Os *Complexos Cumulus Oophorus* (COC's) coletados após cada sessão de aspiração folicular foram submetidos à avaliação morfológica e quantitativa, com o auxílio de um microscópio estereoscópio e aumento de 45 vezes (NIKON Stereo Zoom-Z).

Para a avaliação morfológica dos COC's aspirados utilizou-se a classificação proposta por Mallard et al. (2001) apresentada na Tabela 1. Os ovócitos classificados como grau I, II e III foram considerados viáveis, enquanto os sem cúmulos e atrésicos foram considerados inviáveis.

Tabela 1: Classificação dos *Complexos Cumulus Oophorus* (COC's) bovinos seguindo as descrições de Mallard et al. (2001).

Qualidade COC's	Parâmetros descritivos
Grau I	Ovócitos com citoplasma homogêneo e quatro ou mais camadas de células do cumulus.
Grau II	Ovócitos com citoplasma apresentando alguma granulação e/ou menos de quatro camadas de células de cumulus, incluindo os parcialmente desnudos.
Grau III	Ovócitos com citoplasma homogêneo ou apresentando alguma granulação, e com as células do cumulus expandidas.
Sem cumulus	Ovócitos com citoplasma homogêneo, mas desnudos.
Atrésico	Ovócitos em degeneração.

A quantidade dos COC's, e respectiva qualidade, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e a diferença entre médias testadas pelo teste de *Tukey*, com auxílio do software SAS (2002), utilizando-se 5% de significância.

Resultados e Discussão

Nos resultados médios e desvio padrão da quantidade e qualidade dos COC's aspirados dos ovários de novilhas tratadas e não tratadas com flunixin meglumine e meloxicam, verificou-se efeito ($P < 0,05$) de tratamentos (Tabela 2).

O peso médio dos animais experimentais foi semelhante entre os grupos. No entanto, o tratamento com meloxicam pode levar a reações adversas como perda de apetite, entre outros sintomas (SPINOSA, 2011). Essas reações poderiam justificar a diferença numérica de peso dos animais do tratamento com meloxicam e aqueles não tratados, ou tratados com flunixin meglumine (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados (média \pm desvio padrão) do peso e dados da aspiração de COC's de fêmeas bovinas tratadas e não tratadas com anti-inflamatório. Umuarama-PR, 2010.

Grupos Experimentais/ Resultados obtidos	Grupo I Controle	Grupo II Flunixin meglumine	Grupo III Meloxicam
Peso animais (kg)	468,16 \pm 54,25	451,27 \pm 68,35	378,78 \pm 61,59
Duração OPU (min)	12,14 \pm 5,63	11,74 \pm 4,54	11,00 \pm 6,00
No Fol. a serem aspirados	23,92 \pm 9,57	23,81 \pm 9,88	21,54 \pm 9,42
Total COC's aspirados	19,52 \pm 11,00 ^a	18,37 \pm 9,17 ^a	14,36 \pm 8,82 ^b
COC's viáveis	14,09 \pm 8,53 ^a	12,80 \pm 7,51 ^a	10,02 \pm 6,05 ^b
COC's Grau 1	1,68 \pm 1,59	1,49 \pm 1,57	1,35 \pm 1,22
COC's Grau 2	3,58 \pm 3,06	2,76 \pm 2,41	3,26 \pm 2,41
COC's Grau 3	8,77 \pm 5,66 ^a	8,55 \pm 6,06 ^a	5,39 \pm 4,02 ^b
Ovócitos sem cumulus	3,03 \pm 2,67	2,65 \pm 2,26	2,21 \pm 2,66
Ovócitos atrésicos	2,39 \pm 2,11 ^{a,b}	2,91 \pm 1,84 ^a	2,15 \pm 2,23 ^b

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$).

O número médio de folículos a serem aspirados foi semelhante em todos os tratamentos ($p>0,05$). No entanto, foi numericamente superior ao número de COC's efetivamente aspirados dentro de cada tratamento. Esse achado poderia ser justificado pelas citações de Viana et al. (2003) ao relatarem que o trauma da agulha utilizada pela OPU provoca a fragmentação da parede do folículo, que poderia levar a perda do ovócito a ser aspirado, explicando assim a diminuição do número dos ovócitos efetivamente aspirados (Tabela 2).

Considerando as citações de Viana et al. (2003) sobre a ocorrência de lesões decorrentes dos procedimentos da aspiração na parede do folículo, é possível também que o tratamento com anti-inflamatório meloxicam tenha retardado a recuperação tecidual, resultando em comprometimento da viabilidade dos COC's, como pode ser observado no Grupo III desse estudo, que apresentou menor número médio de COC's viáveis ($p<0,05$), o que não foi observado no grupo Controle ou tratado com flunixin meglumine, que apresentaram número médio de COC's viáveis semelhantes ($p>0,05$).

O meloxicam, um derivado dos ácidos enólicos, promove discrasia sanguínea como trombocitopenia e leucopenia, aumentando o tempo de coagulação, devido ao seu modo irreversível e a incapacidade das plaquetas de sintetizarem a nova cicloxigenase (SPINOSA, 2011). No folículo esse efeito poderia retardar o processo hemorrágico, causado pelo processo de OPU, potencializando a desorganização celular das camadas da parede celular do folículo, relatada por Viana et al. (2003), prejudicando o número e a viabilidade dos ovócitos aspirados, como observado nos animais do grupo III, que apresentaram menor número total de COC's aspirados e menor número de COC's viáveis ($p<0,05$) (Tabela 2).

O número médio de $19,52 \pm 11,00$ COC's aspirados para vacas mestiças foi inferior aos relatos de Thibier (2004) de 25 ovócitos por sessão de aspiração folicular. No entanto, foi semelhante ao relato de Rubin et al. (2005) de 18,6 ovócitos por sessão de aspiração folicular em vacas Nelore, que destacou ainda que ao aumentar a porcentagem de sangue Nelore na constituição racial, há também um incremento na produção de oócitos. Relatos semelhantes foram reafirmados por Bacelar et al. (2010), que trabalharam com animais puros Nelore.

O número de COC's viáveis de $14,09 \pm 8,53$ por sessão de aspiração folicular em fêmeas mestiças foi semelhante a média de 15,2 ovócitos viáveis descrita por Rubin et al. (2005) para fêmeas Nelore, e inferior a 22,9 descrita por Nonato Júnior et al. (2004).

O número médio de ovócitos Grau I e II foi semelhante entre os grupos experimentais ($p>0,05$) (Tabela 2). No entanto, o número médio de ovócitos Grau III foi menor nos animais tratados com meloxicam ($p<0,05$), possivelmente pelo menor número de COC's aspirados.

O número de ovócitos sem cumulus foi semelhante entre os grupos experimentais ($p>0,05$) (Tabela 2), enquanto o número de ovócitos atrésicos apresentou diferença somente entre os grupos tratados com anti-inflamatório, nos quais os animais tratados com meloxicam, apresentaram menor número médio de ovócitos atrésicos ($p<0,05$) (Tabela 2). Os efeitos do flunixin meglumine e do meloxicam sobre o folículo não são relatados na literatura.

Conclusão

Nas condições desse estudo conclui-se:

1. Que o tratamento com flunixin meglumine e meloxicam não interferiu no número médio de folículos a serem aspirados, no número médio de ovócitos Grau I e II, e no número médio de ovócitos sem cumulus, em novilhas mestiças submetidas à aspiração folicular guiada por ultrassom.
2. Que o tratamento com meloxicam diminuiu o número médio total de COC's aspirados, número médio de COC's viáveis e número médio de ovócitos Grau III em novilhas mestiças submetidas à aspiração folicular guiada por ultrassom.
3. Que o tratamento com meloxicam diminuiu o número de ovócitos atrésicos, quando comparado aquele dos animais tratados com flunixin meglumine, e submetidos à aspiração folicular guiada por ultrassom.

Referências

- BACELAR, D. et al. Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com progesterona injetável e benzoato de estradiol. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 161-172, 2010.
- BECKER, F. et al. Comparison of repeated transvaginal ovum pick up in heifers by ultrasonographic and endoscopic instruments. **Theriogenology**, Iowa, v. 46, p. 999-1007, 1996.
- BOLS, P.; LEROY, J.; VIANA, J. Aspectos técnicos e biológicos na recuperação de oócitos via transvaginal guiada por ultra-som em vacas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 103-118, 2005.
- BONI, R. et al. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, Iowa, v. 48, p. 277-289, 1997.
- KRUIP, T. A. A new method of bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. **Veterinary Record**, London, v. 128, p. 208-210, 1991.
- MALARD, P. F. et al. Índice de recuperação e qualidade de ovócitos de bezerras Nelore, superovuladas e não superovuladas, de dois a três meses de idade. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 6, 2001.
- NONATO JUNIOR, I. et al. Produção de embriões em vacas Nelore com utilização associada de FIV e TE. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, p. 95, 2004.
- PIETERSE, M. C. et al. Characteristics of bovine oestrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. **Theriogenology**, Iowa, v. 35, p. 401-413, 1991.
- RENESTO, A. **Associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos.**

2004. 59f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

RUBIN, K. C. P. et al. Influência do grau de sangue Nelore na produção in vivo de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 183, 2005.

SANTL, B. et al. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. **Theriogenology**, Iowa, v. 50, p. 89-100, 1998.

SENEDA, M. M. et al. Situação atual da aspiração folicular e da fecundação in vitro. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. **Anais...**, 2006. p. 172-180.

SNEL-OLIVEIRA, M. V. et al. Histopathological lesions in the ovaries after ultrasound guided transvaginal ovum pick up (OPU) in Nelore prepubertal calves. **Theriogenology**, Iowa, v. 57, n. 1, p.167, 2002.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. SAS Enterprise guide. Versão 2.0. Cary: **SAS Institute Inc.** 2002. CD-ROM.

SPINOSA, H. S. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 918 p.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, p. 12-19, 2004.

VIANA J. H. M. et al. Caracterização de sequelas subsequentes à punção folicular em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 23, n. 3, p.119-124, 2003.

Recebido em: 16/02/2011

Aceito em: 21/07/2013

HOSPITAL VETERINÁRIO UNIPAR

Clínica de Pequenos Animais



Rod. PR 480, s/n, Km 14, Campus II - 87500-000 - Umuarama - PR
Fone: (44) 3621-2550

