

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARDIOMIOPATIA DILATADA EM SUÍNOS NO BRASIL**

**Raquel Aparecida Sales da Cruz**

Porto Alegre,

Fevereiro/2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARDIOMIOPATIA DILATADA EM SUÍNOS NO BRASIL**

**Autor:** Raquel Aparecida Sales da Cruz

**Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária Preventiva e Patologia.**

**Orientador:** David Driemeier

Porto Alegre

Fevereiro/2017

CIP - Catalogação na Publicação

Cruz, Raquel Aparecida Sales da  
Cardiomiopatia dilatada em suínos no Brasil /  
Raquel Aparecida Sales da Cruz. -- 2017.  
63 f.

Orientador: David Driemeier.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2017.

1. insuficiência cardíaca congestiva. 2. doenças  
cardíacas. 3. suinocultura. 4. nutrição. 5.  
histopatologia. I. Driemeier, David, orient. II.  
Título.

RAQUEL APARECIDA SALES DA CRUZ  
CARDIOMIOPATIA DILATADA EM SUÍNOS NO BRASIL

Aprovada em: 21/05/2017

Aprovada por:

---

Prof. Dr. David Driemeier  
Orientador e Presidente da Banca

---

Prof. Dr. Cláudio Severo Lombardo de Barros  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. David Emílio Santos Neves de Barcellos  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Alexandre de Mello Kessler  
Membro da Comissão

## DEDICATÓRIA

Á minha mãe Margarida, minha tia  
Clarice (in memoriam) e ao meu avô  
Cláudio. Por todo amor e carinho de  
sempre para sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus em primeiro lugar pela minha vida.

Á minha melhor mãe do mundo Margarida, por ser a pessoa que mais amo e admiro. Por todos estes anos de estímulo, financiamento e exemplo. Ao meu avó Cláudio por todo amor e carinho de sempre. A toda minha família, pois certamente os maiores e melhores ensinamentos eu tive dentro de casa.

Ao meu orientador David Driemeier por todo ensinamento, parceria, confiança, entusiasmo e exemplo ao longo destes quatro anos. Especialmente por sempre ser, uma fonte inesgotável de inspiração como pessoa e como patologista.

Aos professores do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS Saulo Petinatti Pavarini e Luciana Sonne pelos ensinamentos diários, paciência e exemplo. Com toda a certeza as atividades complementares a rotina de diagnóstico, implementadas por vocês, fizeram e farão toda a diferença na nossa formação como patologistas.

Á todos os colegas de pós-graduação, estagiários do SPV e estagiários curriculares, que tive oportunidade de conviver e aprender ao longo destes quatro anos. Por sempre elevarem o nível, servindo de exemplo e inspiração.

Aos colegas que ajudaram no desenvolvimento deste projeto. Os que conduziram os experimentos comigo; Dani, Júlia Guazelli, Matheus Reis, Fabi, Marina e Fernando Soares. Além de todos os outros que auxiliaram em outras etapas; Maiara, Kivia, Guilherme, Cláudio, Lorena, Danilo, André Dalto, Paulinha, Márcia, Rafaela, Bianca, Claiton, Ronaldo Bianchi, Jéssica, Carol, Matheus Bianchi, Luiz, Welden e Ana Mori. Além de todos os estagiários curriculares que auxiliaram durante os abates. Á todos o meu mais sincero agradecimento.

Ao professor Alexandre Kessler e equipe do LEZO-UFRGS. As empresas e veterinários da Migplus (Flauri Migliavacca e Elço Maschio), Fatec (Danillo Barros) e a Languiru (Fabiane Hinnah, Mônica Siegert, Gilberto Schwarz e Joel Girardello) por toda a colaboração neste projeto.

As técnicas do SPV Bárbara, Cíntia e Marcele por toda a ajuda. Especialmente a Bárbara Krebs por todos os cortes perfeitos confeccionados para este estudo.

Aos professores da UFLA Angélica, Flademir, Djaison, Mary, graduandos e pós-graduandos. O período em que estive em Lavras foi de grande aprendizado. Em especial agradeço a professora Angélica por toda a ajuda.

Aos patologistas da Iowa State University, realmente foi um sonho realizado estar um período com vocês. Não tenho como dizer o quanto me acrescentou esta experiência, tanto na minha vida pessoal quanto profissional, só posso realmente agradecer. Em especial ao Dr. Paulo Arruda, Dr. Bayle Arruda e Dr. Kent Schwartz. Estendo o agradecimento á amigos queridos que sem eles este sonho não seria possível; Veronica Rolim, Fabi Boabaid, David Driemeier e Luiz Gustavo, nunca poderei esquecer apenas agradecer. Aos amigos de Ames que fiz ou reencontrei, foi um grande prazer.

Aos amigos queridos que me acolheram em Porto Alegre. Alguns com quais eu dividi a vida e a casa; Fabi, Luiz, João Xavier, Marla, Matheus Reis e Marina. Á amigos pela convivência dentro e fora do SPV; Dani, Gisele, Paula Pili, Verônica, Maiara, Cláudio e Lorena (Loris). A família da “beira do Ipiranga” Kivia (Kivis), Bárbara (Bah), Matheus (Teteus), Camila (Cami), Lauren e Marina por encherem meus dias de alegria. Foram muitos momentos de alegrias outros de tristeza, mas com certeza vocês estarão sempre no meu coração, ali nas minhas melhores lembranças.

Á CAPES e CNPq pelo financiamento de bolsa e projeto.

## **EPIGRAFE**

O conhecimento exige uma presença curiosa do sujeito em face do mundo. Requer uma ação transformadora sobre a realidade. Demanda uma busca constante. Implica em invenção e em reinvenção. (Paulo Freire)

## RESUMO

### CARDIOMIOPATIA DILATADA EM SUÍNOS NO BRASIL

Autor: Raquel Aparecida Sales da Cruz

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

Cardiomiopatia dilatada (CMD) é uma doença miocárdica caracterizada por dilatação cardíaca e redução da contratilidade da parede do ventrículo esquerdo ou de ambos os ventrículos, sendo a etiologia de origem genética ou desconhecida. Em suínos existem raros relatos de CMD, sendo frequentemente relacionados com intoxicações por ionóforos ou gossípol. Surtos de CMD de etiologia desconhecida em suínos de rebanhos comerciais no Brasil sugeriram a existência de nova etiologia, possivelmente nutricional. Este estudo teve como objetivo investigar as possíveis causas dos surtos de CMD em suínos, a partir de análises macroscópicas, microscópicas, bioquímicas, cromatográficas, moleculares, imuno-histoquímica (IHQ) e reprodução experimental. E teve como resultado 2 artigos científicos. O primeiro artigo descreve os achados clínicos, patológicos, químicos e toxicológicos de três surtos de CMD em suínos de crescimento, além da reprodução experimental desta condição utilizando a ração de uma das propriedades afetadas. Para o estudo experimental utilizou-se 9 animais divididos em 3 grupo; Grupo 1 recebendo ração suspeita, Grupo 2 metade ração suspeita mais metade de ração controle e o grupo 3 recebeu ração controle. Dois suínos do grupo 1 apresentaram condições clínicas e patológicas semelhantes aos casos naturais após 8 dias de consumo da ração suspeita. Os principais sinais clínicos observados eram tosse e dispnéia grave. Na necropsia foram constatados dilatação cardíaca bilateral acentuada, hidrotórax, hidropericárdio, edema pulmonar, ascite e fígado com aspecto de noz moscada. O segundo artigo teve como objetivo fazer a caracterização histológica, histoquímica e imuno-histoquímica das lesões cardíacas em 8 suínos com CMD e compara-las com dois suínos controles. As principais lesões evidenciadas foram atrofia de cardiomiócitos, vacuolização sarcoplasmática, ruptura de miofibras e fibras com padrão ondulado evidenciadas nas colorações de hematoxilina e eosina (HE), Tricrômico de Masson e Picrosírius. Na análise imuno-histoquímica utilizando o anticorpo anti-desmina houve uma imunomarcagem reduzida ou inexistente em áreas com lesões histopatológicas. A imuno-histoquímica anti-desmina demonstrou ser uma importante ferramenta diagnóstica para caracterização de lesões de CMD em suínos.

**Palavras-chave:** insuficiência cardíaca congestiva, doenças cardíacas, suinocultura, nutrição, histopatologia.

## ABSTRACT

### DILATED CARDIOMYOPATHY IN SWINE IN BRAZIL

*Author: Raquel Aparecida Sales da Cruz*

*Advisor: Prof. Dr. David Driemeier*

*Dilated cardiomyopathy (DCM) is a myocardial disease characterized by cardiac dilatation and reduced contractility of the left ventricular wall or both ventricles, the etiology of which is genetic or unknown. In pigs there are rare reports of DCM and are often related to ionosphere or gossypol poisoning. DCM outbreaks of unknown etiology in swine from herds in Brazil suggested the existence of a new, possibly nutritional, etiology. This study aimed to investigate the possible causes of DCM in pigs through macroscopic, microscopic, biochemical, chromatographical, molecular and immunohistochemical (IHC) evaluations, as well as the experimental reproduction of the disease. The project resulted in 2 scientific papers. The first article describes the clinical, pathological, chemical and toxicological findings of three DCM outbreaks in grower pigs, in addition to the experimental reproduction of this condition using the ration of one of the affected farms. For the experimental trial, 9 animals were divided into 3 groups; Group 1 received suspected ration only, Group 2 was fed a diet composed of half suspected ration plus half control ration, and group 3 received control ration only. Two pigs from group 1 presented clinical and pathological conditions similar to the natural cases after 8 days of consumption of the suspected ration. The main clinical signs observed were cough and severe dyspnea. At necropsy, bilateral cardiac dilatation, hydrothorax, hydropericardium, pulmonary edema, ascites and liver with the appearance of nutmeg were observed. The second article aimed to perform the histological, histochemical and immunohistochemical characterization of the cardiac lesions in 8 pigs with DCM and compare it with two control pigs. The main lesions evidenced were cardiomyocyte atrophy, sarcoplasmic vacuolization, rupture of myofibers and fibers with corrugated pattern evidenced in the staining of hematoxylin and eosin (HE), Masson's trichrome (MT) and Picrosírius (PS). Immunohistochemistry analysis using the anti-desmin antibody showed reduced or non-existent immunostaining in areas with histopathological lesions. The anti-desmin IHC proved to be an important tool for the diagnosis and characterization of DCM lesions in pigs.*

*Keywords: congestive heart failure, heart diseases, swine production, nutrition, histopathology*

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1 Cardiomiopatia: conceitos e classificação .....	14
2.2 Cardiomiopatia Dilatada (CMD) .....	14
2.2.1 Fisiopatologia da CMD .....	15
2.2.3 Caracterização macroscópica e microscópica .....	16
2.2.4 Cardiomiopatia dilatada em suínos .....	18
<b>3.0 OBJETIVOS</b> .....	21
3.1 Objetivos gerais .....	21
3.2 Objetivos específicos .....	21
<b>4. RESULTADOS</b> .....	21
4.1 Artigo 1 .....	21
4.2 Artigo 2 .....	43
<b>5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	59
<b>6.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

Na suinocultura para o estabelecimento de um diagnóstico etiológico preciso, necessita-se de uma abordagem ampla do problema, já que geralmente se tratam de doenças de rebanho. Todas as possíveis causas devem ser consideradas, estas podem ser listadas como DAMNIT; na qual D seriam causas degenerativas, A anomalias, M doenças metabólicas, I as doenças infecciosas, inflamatórias e imune, N causas nutricionais e T lesões traumáticas ou tóxicas (RAMIREZ et al., 2012).

As principais doenças que acometem suínos são infecciosas de origem multifatorial, sendo as doenças nutricionais, metabólicas, tóxicas ou traumáticas pouco diagnosticadas. Isso ocorre por se tratarem de um desafio na clínica de suínos, pois exigem um estudo detalhado dos fatores epidemiológicos e de manejo bem como um aporte laboratorial especializado. Estas doenças podem afetar os diversos sistemas do organismo como o digestório, cardiovascular, locomotor e nervoso (SOBESTIANSKY et al., 2012; REESE; MILLER., 2012).

Existem diversos relatos de algumas doenças de origem não infecciosa, que afetam o coração de suínos como: doença do coração de amora responsiva a vitamina E e selênio (SHEN et al 2011, PALLARES et al 2002), intoxicações por gossipol, ionóforos e fumonisina além de raros relatos de deficiências pelos seguintes minerais: chumbo, cobalto, cobre e ferro (SMITH, 1957; VAN VLEET; FERRANS, 1986, HARRISON et al 1990, NOGUEIRA et al., 2009, ENSLEY; OSWEILER, 2012).

Frequentemente estas doenças provocam um quadro de cardiomiopatia, que ocorre quando há uma alteração estrutural e funcional do miocárdio não apresentando alterações vasculares ou valvulares congênicas ou adquiridas. Há ainda dilatação ou hipertrofia de um ou ambos os ventrículos, sendo possível a dilatação de todas as câmaras cardíacas, por vezes associada à fibrose difusa (ROBINSON et al 2016, RICHARDSON et al. 1995).

Estas cardiomiopatias podem ser classificadas em dilatada, hipertrófica e restritiva de acordo com o padrão morfológico da lesão miocárdica e ainda podem ser divididas em primárias quando forem de origem genética e secundárias quando a causa for conhecida e não genética (ROBINSON et al 2016).

A cardiomiopatia dilatada (CMD) corresponde a alterações miocárdicas primárias caracterizadas por redução da contratilidade e dilatação ventricular, envolvendo o ventrículo esquerdo ou ambos os ventrículos, sendo de etiologia desconhecida ou familiar (RICHARDSON et al 1995). Em suínos há relatos de CMD associada a intoxicações por gossipol, antibióticos ionóforos e deficiências minerais (SMITH, 1957; VAN VLEET; FERRANS, 1986, NOGUEIRA et al., 2009, ENSLEY; OSWEILER, 2012).

Três surtos de mortalidade por insuficiência cardíaca congestiva associada à cardiomiopatia dilatada em suínos de rebanhos comerciais em diferentes Estados do Brasil foram diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária (SPV), FAVET (Faculdade de Veterinária) da UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Casos de cardiomiopatias são raros na suinocultura e normalmente estão associadas a um número restrito de etiologias. O primeiro surto ocorreu em 2001 e as avaliações laboratoriais descartaram as principais causas tóxicas de CMD em suínos, mas não houve a determinação da etiologia. Em 2014, ocorreram dois novos surtos de CMD em localidades distintas do primeiro. Esse aumento na ocorrência de casos motivou o estabelecimento de uma investigação diagnóstica mais aprofundada dos surtos de CMD, através de novas análises laboratoriais e estudo experimental.

## **2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Cardiomiopatia: conceitos e classificação**

O termo cardiomiopatia (CM) foi descrito pela primeira vez em medicina humana, espécie em que essa alteração cardíaca é mais estudada (KREHL, 1891). Atualmente em humanos definiu-se CM como grupo diverso de doenças do músculo cardíaco, em que o miocárdio encontra-se estrutural e funcionalmente alterado, na ausência de doenças das artérias coronárias, hipertensão, doenças cardíacas congênitas ou valvulares (ELLIOTT et al., 2008).

Cardiomiopatia em espécies animais é definida como doença em que o miocárdio está estruturalmente e funcionalmente alterado, não apresentando alterações vasculares ou valvulares congênitas ou adquiridas. Há ainda dilatação ou hipertrofia de um ou ambos os ventrículos, sendo possível a dilatação de todas as câmaras cardíacas. Com exceção da cardiomiopatia devido ao hipertireoidismo em gatos (ROBINSON & ROBINSON 2016).

De acordo com o padrão morfológico das lesões as CM em animais são classificadas em dilatada, hipertrófica e restritiva. Etiologicamente são subdivididas em primárias (origem genética ou suspeita de origem genética) e secundárias (etiologia conhecida e não genética) (RICHARDSON et al 1995, O'GRADY et al 2004, ROBINSON et al 2016).

### **2.2 Cardiomiopatia Dilatada (CMD)**

A cardiomiopatia dilatada (CMD) é uma doença miocárdica primária progressiva, caracterizada por dilatação ventricular, envolvendo o ventrículo esquerdo ou ambos os ventrículos, sendo de etiologia desconhecida ou familiar. Esta alteração pode conduzir à insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e a arritmias que acabam por determinar a morte (RICHARDSON et al 1995, O'GRADY et al 2004, HARVEY; LEINWAND., 2011, ELLIOTT et al., 2008).

Na CMD o miocárdio encontra-se enfraquecido e dilatado, não conseguindo bombear o sangue de forma eficiente pelo organismo. Macroscopicamente as câmaras cardíacas estão

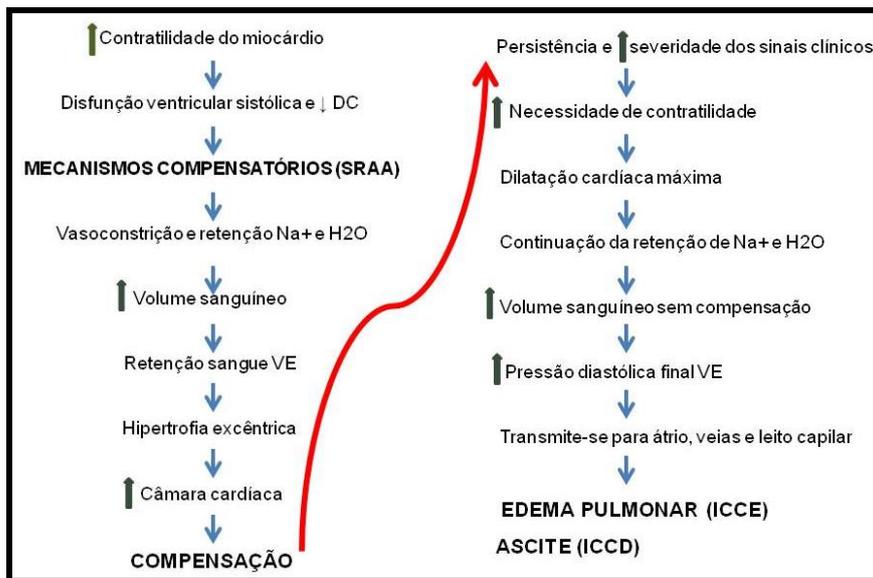
dilatadas e o miocárdio com aspecto flácido (HARVEY; LEINWAND, 2011). Em humanos a CMD é principal cardiomiopatia diagnosticada e em animais também está entre as principais causas de ICC (MILLER et al 2012, ROBINSON et al 2016).

### 2.2.1 Fisiopatologia da CMD

A patogênese e morfologia da CMD são heterogêneas. A agressão ventricular é frequente, havendo um aumento do volume e redução da função sistólica (hipossistolia), acarretando diminuição do débito cardíaco (DC). O organismo responde através de mecanismos compensatórios neuro-humorais, ativando o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) e hormônios antidiuréticos como os peptídeos natriuréticos atriais (ANP), que faz vasoconstrição, retém sódio e água, na tentativa de manter o débito cardíaco e prevenir a ICC. Com isso, há um aumento no volume sanguíneo circulante pelo corpo e também intracardíaco o que sobrecarrega o ventrículo esquerdo (VE). Para compensar o aumento do volume sanguíneo, o VE sofre uma hipertrofia excêntrica, que ao passar do tempo, gera sobrecarga desses mecanismos compensatórios podendo levar a ICC. Quando isso ocorre, o coração dilata até seu limite com perda da contratilidade. (ALBANESI, 1998; LOBO et al., 2002).

Com a manutenção dos mecanismos compensatórios, há um aumento da pressão diastólica final ( $pd_2$ ), que eleva a pressão atrial, responsável pela congestão retrógrada. O aumento na pressão atrial esquerda culmina com elevação da pressão venocapilar pulmonar, levando a congestão e edema pulmonar. Na pressão atrial direita há um aumento da pressão nas veias cavas que ocasiona a congestão sistêmica e ascite. A insuficiência valvar atrioventricular agrava a CMD. A mitral, por desviar parte do sangue que deveria ser ejetado pelo VE agrava a congestão venocapilar pulmonar, pois aumenta o volume de sangue que retorna ao VE na sístole seguinte, agravando a dilatação. Se todos os mecanismos compensatórios falharem, o débito cardíaco diminui a tal ponto que a pressão arterial sistêmica baixíssima leva a um quadro de choque cardiogênico (ALBANESI, 1998; LOBO et al., 2002).

Figura 1. Fisiopatologia da CMD



Fonte: Lobo et al 2002

### 2.2.3 Caracterização macroscópica e microscópica

Macroscopicamente o coração está aumentado de volume, com dilatação das câmaras cardíacas, principalmente dos ventrículos, ganhando a forma globosa, assumindo um aspecto flácido com um peso de 20 a 50% acima do normal (ESWARDS, 1987). É descrito que em felinos há, por vezes, uma maior dilatação do ventrículo esquerdo. Em cães, 85% dos casos ocorre dilatação de todas as câmaras cardíacas (SISSON; THOMAS, 1995; TIDHOLM; JÖNSSON, 1997).

Microscopicamente os cardiomiócitos encontram-se alongados e vacuolizados, devido à perda de miofibrilas contráteis. Os núcleos estão hipertrofiados devido ao aumento na síntese de DNA, podendo apresentar aspecto polipoide, hiper cromáticos com cromatina heterogênea. Pode-se observar também ruptura de miofibras, infiltrado intersticial de macrófagos e linfócitos, além de deposição de tecido conjuntivo fibroso, principalmente perivascular. Em alguns casos observa-se também aterosclerose. Todas essas alterações histológicas indicam a lesão cardíaca, mas não especificam a causa (EDUWARDS, 1987, DAVIES 2000, RADU et al 2012).

Em cães, espécie animal em que a doença é mais estudada, descrevem-se dois tipos de padrões de lesão: infiltração gordurosa degenerativa observada em cães das raças Boxer e Dobermann; e o padrão de fibras onduladas observado em raças de médias ou gigante (TIDHOLM; JÖNSSON, 2005).

#### 2.2.4 Cardiomiopatia dilatada em animais

A CMD pode ocorrer em diversas espécies animais, mas é mais relatada e estudada em cães e gatos. Em cães é uma das doenças cardíacas mais comuns, ficando atrás apenas das alterações degenerativas de válvulas e dirofilariose em algumas regiões. Pode ocorrer em todas as idades, mas é mais comumente diagnosticada em cães machos (relação 2:1s) com idade entre 4 e 10 anos. (LOBO et al., 2002).

A CMD, frequentemente, acomete cães de raças grandes e todas as raças gigantes. Cães da raça Dobermann são afetados em número de casos superior a todas as outras raças juntas. A predisposição de algumas raças e linhagens familiares sugere um componente hereditário à etiologia. A CMD pode ter diversas causas como: genética ou familiar, infecção viral, doenças autoimunes, toxinas, deficiência nutricional (taurina), intoxicação por gossipol, taquicardia persistente ou recorrente e uso de certos antineoplásicos (KEENE 1994; SISSON et al., 1999; MAXIE et al., 2007; MILLER et al., 2012).

Em felinos, a CMD é uma doença ventricular predominante do lado esquerdo, caracterizada por dilatação da câmara e diminuição da função miocárdica sistólica. Na década de 80, quando ainda não havia muitos estudos sobre nutrição de felinos, a principal cardiomiopatia diagnosticada era a CMD que foi sendo posteriormente, associada a uma deficiência dietética de taurina. A subsequente suplementação desse aminoácido na dieta resultou em um declínio significativo na ocorrência da CMD em felinos. (SISSON; THOMAS, 1995).

Atualmente, a CMD é rara em gatos, mas ocasionalmente, registram-se casos sem evidência de deficiência de taurina e que não melhoram por meio de suplementação. Esses casos podem representar um estágio final de algum outro processo patológico e são considerados exceção entre gatos com sinais de insuficiência cardíaca (FERASIN et al., 2003). CMD por deficiência de taurina previamente relatada também em raposas, (MILLER et al., 2012), além da cardiomiopatia dilatada hereditária em bovinos (NART et al., 2002, BUCZINSKI et al., 2010, HORIUCHI et al., 2015).

Em perus descreve-se uma cardiomiopatia espontânea denominada de “doença do coração redondo dos perus”. No rebanho comercial de perus, a mortalidade por CMD ocorre

em animais jovens com até três semanas de idade, mas podem ocorrer em perus com 6-8 semanas de idade e esporadicamente em animais adultos (FRAME 1991). Na necropsia observa-se principalmente dilatação cardíaca e alterações secundárias a insuficiência cardíaca. A etiopatogenese continua indefinida, mas alguns estudos demonstram que a diminuição na concentração de cloreto de sódio na dieta diminuíram a frequência de casos (CZARNECKI 1984; CLARK et al., 1995, FRAME et al., 2001, STENZEL et al., 2008). Alguns autores relatam ainda, genes específicos de perus como causadores da CMD, que podem servir de modelo para estudos em humanos (LIN et al., 2007, REED et al 2007). Enquanto outros pesquisadores indicam a existência de fatores nutricionais envolvidos no desenvolvimento da doença (ROBERSON et al., 2005).

## 2.2.4 Cardiomiopatia dilatada em suínos

### 2.2.4.1 Intoxicação por Gossipol

O gossipol é um subproduto tóxico derivado do processamento do algodão, encontrado no farelo de algodão, que pode ser utilizado na ração animal. Os níveis de gossipol no farelo dependem do tipo de algodão plantado, região geográfica da plantação, clima e processo de extração do óleo (SMITH, 1957; ENSLEY; OSWEILER, 2012; SOBESTIANSKY et al., 2012).

Os tratamentos térmicos aplicados ao farelo de algodão favorecem a formação de complexos inertes e indigeríveis entre o gossipol e a lisina. A forma complexa do gossipol não é tóxico aos animais, pois o complexo não é absorvido no trato gastrointestinal dos mesmos. Entretanto, pode ocorrer diminuição na disponibilidade da lisina e na digestibilidade da proteína (MELLO, 2012).

A toxicidade do gossipol pode ser prevenida pela adição de sais de ferro na dieta, como o sulfato ferroso. Para níveis superiores a 100 ppm de gossipol livre a relação entre ferro e gossipol livre deve ser de 1:1 (ENSLEY; OSWEILER, 2012; SOBESTIANSKY et al., 2012).

Após a ingestão do gossipol, os sinais clínicos podem levar semanas ou meses para aparecerem. Os principais sinais clínicos observados são dispneia grave seguida de morte. Na necropsia observa-se dilatação cardíaca bilateral, congestão e necrose hepática, necrose em

músculo esquelético e edema severo em tecido subcutâneo e vísceras (SMITH, 1957; OCARINO et al., 2010; ENSLEY; OSWEILER 2012; SOBESTIANSKY et al., 2012).

#### 2.2.4.2 Intoxicação por ionóforos

Os antibióticos ionóforos são produzidos através da fermentação e podem ser divididos em três classes: neutros, formadores de canal e carboxílicos. Os ionóforos carboxílicos, também conhecidos como antibióticos poliéteres, são os mais utilizados na medicina veterinária. Estes são produtos da fermentação de várias espécies de *Streptomyces ssp* e *Actinomadura ssp*, sendo os mais conhecidos a monensina, lasalocida, nasarina e salinomicina (NOGUEIRA et al., 2009).

Na alimentação de animais, os ionóforos são utilizados como coccidiostáticos ou promotores de crescimento. Há grande variação na susceptibilidade dos efeitos tóxicos dos ionóforos de acordo com a espécie animal. A utilização desses antibióticos em suínos é baixa, mas há alguns relatos de intoxicações por uso excessivo ou por combinações com outros antibióticos como lincomicina e tiamulina. A DL50 descrita para monensina é de 16,8 mg/kg, com lasalocida já foram relatadas intoxicações com 35 e 58 mg/kg, e de salinomicina, foram descritas doses tóxicas de 8,6 mg/kg quando associadas a doses de 4 mg/kg de tiamulina. O quadro clínico-patológico caracteriza-se por ataxia, letargia, fraqueza muscular, mioglobínúria e diarreia. Em casos mais crônicos há um quadro de cardiomiopatia que progride para insuficiência cardíaca congestiva (MISKIMINS; NEIGER 1996; KONSTANZE et al., 2005, SOBESTIANSKY et al., 2012).

#### 2.2.4.3 Deficiências de cobre, ferro, chumbo e cobalto

A ocorrência de deficiências nutricionais na suinocultura é rara, o que se deve a melhora nas práticas de manejo nutricional adotadas nos últimos anos. Entretanto, podem ainda ocorrer devido a algum erro na formulação das rações (REESE; MILLER, 2012, SOBESTIANSKY et al., 2012). Há escassos relatos de deficiências de alguns minerais como o cobre, ferro, chumbo e cobalto como causadores de alterações cardíacas (VAN VLEET; FERRANS, 1986). Estudos experimentais realizados com suínos de crescimento, consumindo dieta deficiente em cobre, reproduziu um quadro de cardiomiopatia progredindo para ICC (COULSON; CARNES, 1963; WILDMAN et al., 1996). Casos de deficiência de ferro em suínos de creche causando dilatação cardíaca também são descritas, porém poucas

informações existem sobre as alterações clínico-patológicas. (BOULTON, 1996). As deficiências minerais podem levar a um quadro de cardiomiopatia, porém existem poucas informações sobre a real importância dessas alterações na suinocultura atual.

#### 2.2.4.4 Intoxicação por fumonisinas

Os primeiros surtos de intoxicação por fumonisinas ocorreram nos Estados Unidos em 1989, após o consumo de rações produzidas com milho contaminado (HARRISON et al 1990), desencadeando um quadro de edema pulmonar suíno (EPS).

A doença foi reproduzida experimentalmente em suínos após a administração intravenosa de fumonisina B1 (FB1) e os suínos apresentaram lesões hepáticas consistindo de apoptose, necrose e proliferação de hepatócitos. Em casos crônicos, houve a formação de placas no esôfago, nódulos hepáticos e hipertrofia do ventrículo direito (HARRISON et al 1990).

Em suínos, como nas outras espécies, a fumonisina altera a biossíntese de esfingolipídios, o que altera a concentração de esfingosina e esfinganina em órgãos como rim, fígado, pulmão e coração. No coração há diminuição da contratilidade do ventrículo esquerdo, diminuição da pressão arterial, da frequência cardíaca e do débito cardíaco. Essas alterações pulmonares e cardíacas são creditadas ao aumento de esfingosina ou esfinganina que inibe os canais de cálcio, induzindo edema pulmonar e insuficiência cardíaca do lado esquerdo (HASCHEK et al., 2001).

#### 2.2.4.5 Estresse

Collins et al., (2015) descrevem um caso de cardiomiopatia dilatada espontânea em um suíno da raça Yorkshire que seria utilizado em experimentação animal. Este suíno morreu após dois dias de alojamento e 13 horas em jejum pré-estudo experimental no laboratório, sem qualquer sinal clínico.

Na necropsia observou-se cardiomiopatia dilatada severa caracterizada por ventrículos marcadamente dilatados e delgadas paredes ventriculares e de septo interventricular. Histologicamente, houve adelgaçamento moderado de miofibras e perda irregular de estrias cruzadas. O fígado continha hemorragia centrolobular maciça e difusa, além de degeneração de hepatócitos. O diagnóstico de cardiomiopatia dilatada com insuficiência cardíaca direita e

degeneração hepática secundária se baseou nos achados anatomopatológicos e ausência de deficiência de selênio em resultados laboratoriais.

### **3.0 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Investigar as possíveis etiologias dos casos naturais de cardiomiopatia dilatada em suínos, a partir de análises macroscópicas, microscópicas, bioquímicas, cromatográficas, moleculares, imuno-histoquímicas e por reprodução experimental.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Descrever as alterações clínicas, macroscópicas e histológicas dos casos naturais e experimentais de CMD
- Reproduzir do quadro clínico-patológico de CMD em suínos
- Determinar da etiologia da CMD
- 

### **4. RESULTADOS**

Os resultados serão apresentados na forma de artigo científico. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um artigo científico.

#### **4.1 Artigo 1**

Neste item é apresentado o artigo intitulado “Outbreaks of dilated cardiomyopathy in nursery pigs in Brazil” foi submetido à revista Veterinary Pathology.

## **Outbreaks of dilated cardiomyopathy in nursery pigs in Brazil**

Raquel A S Cruz, Daniele M Bassuino, Matheus O Reis, Cláudio J M Laisse, Caroline P Andrade, Andréia Henzel, Paulo H.E. Arruda, Saulo P Pavarini, Luciana Sonne, Alexandre M Kessler and David Driemeier<sup>1</sup>

From the Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Cruz, Bassuino, Oliveira, Laisse, Andrade, Pavarini, Sonne and Driemeier), Laboratório de Ensino Zootécnico (UFRGS), Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Kessler), Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil (Henzel) and Veterinary Diagnostic Laboratory, Iowa State University, Ames, Iowa, United States (Arruda).

<sup>1</sup>Corresponding author: David Driemeier, Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davepat@ufrgs.br

**Abstract.** Dilated cardiomyopathy (DCM) is a condition that affects the myocardium, and it is seldom reported in pigs. DCM is characterized by the appearance of ventricular dilation, which results in systolic dysfunction and secondary diastolic dysfunction. These conditions can lead to fatal congestive heart failure and arrhythmias. This study describes three outbreaks of heart failure associated with DCM especially in nursery pigs and includes an experimental approach in order to reproduce this condition. The clinical signs observed were dyspnea, apathy, and anorexia. The findings from necropsy were marked bilateral ventricular dilatation, hydrothorax, hydropericardium, nutmeg liver, and pulmonary edema, and these conditions were observed in fourteen spontaneously affected piglets. The histology of the heart revealed myofiber hypertrophy and vacuolization, waving of myofibers, interstitial edema and mild deposition of fibrous connective tissue, mainly perivascular. There was marked diffuse hepatic centrolobular congestion. In the experimental study, 9 piglets were divided into three groups: 1) receiving suspected feed, 2) receiving only control feed and 3) receiving half suspected feed and half control feed. Two piglets from group 1 displayed clinical and pathological signs similar to those of spontaneously affected piglets after eight days of consuming the suspected feed. To isolate the cause of outbreak, the laboratory tests excluded the involvement of main known nutritional and infectious causes of cardiomyopathy in pigs. The results demonstrated that the DCM outbreaks were likely associated with the diet consisting primarily of a low-quality soybean meal, and this was confirmed by the experimental study.

**Keywords:** heart failure, piglets, soybean meal, experimental study

Cardiomyopathy (CM) is a disease that involves a diverse group of structural and/or functional alterations in the myocardium. Cardiomyopathy is diagnosed when there is an absence of coronary artery disease, hypertension, valvar disease and congenital heart disease with the presence of dilatation or hypertrophy of one or both ventricles and possibly all four chambers of the heart. This disease affects humans and domestic animals and can generally be categorized into three morphologic forms: dilated (congestive), hypertrophic and restrictive.<sup>7, 22</sup>

Dilated cardiomyopathy (DCM) is the primary myocardial disorder of unknown or familial etiology characterized by the reduced contractility and ventricular dilation involving the left or both ventricles of the heart. For the cases of DCM with a specific cause, a modifier indicating this etiology precedes the term cardiomyopathy, such as taurine deficiency cardiomyopathy.<sup>21</sup>

DCM is the main type of cardiomyopathy that is diagnosed in humans, and it is also one of the main causes of congestive heart failure in animals.<sup>21, 14, 22</sup>

DCM has been studied in several species, but it has been extensively studied in dogs.<sup>14</sup> One form DCM known as “round heart disease” has been discovered in turkeys, and this form of DCM does not have a well-defined etiopathogenesis<sup>4, 24</sup> In cattle, DCM with a familial genetic origin has been determined to be an autosomal recessive inherited disease<sup>14</sup>.

In swine, DCM has been associated with gossypol poisoning, ionosphere poisoning, and cardiomyopathy with an undetermined origin.<sup>16, 13, 14, 20, 25, 3</sup>

DCM is diagnosed by the appearance of the following symptoms: ventricular dilation, systolic dysfunction, and secondary diastolic dysfunction. These alterations can then progress to congestive heart failure and arrhythmias, which will eventually

lead to death.<sup>21, 7, 8</sup> The myocardium is weakened and is unable to pump blood efficiently. The cardiac chambers are dilated macroscopically, and the myocardium appears to be thinner and flaccid.<sup>5, 8, 15</sup>

The main objectives of this study were 1) to describe the clinical, pathological, chemical and toxicological findings associated with three outbreaks of dilated cardiomyopathy in nursery pigs and 2) to experimentally reproduce this condition by using the feed from sites where cases were diagnosed.

## **Materials and methods**

### **Spontaneous cases: clinical, epidemiological and histopathological features**

Between 2011 and 2014, porcine tissue samples, including liver, heart, lung, spleen, kidney and lymph nodes, were collected from three farms located in the following states: Paraná (farm A), Rio Grande do Sul (farm B), and Mato Grosso do Sul (farm C). All of these farms have reported high mortality rates.

The histopathological examination of the tissues revealed lesions that are consistent with congestive heart failure. The authors conducted site visits to the three farms. During these site visits, information regarding clinical signs, epidemiology, feeding (farm B) and soybean meal content (farms B and C) were obtained from the veterinarians working at the farms. Fourteen necropsies and microscopic examinations were performed in 4 piglets from farm A, 6 piglets from farm B, and 4 piglets from farm C.

The tissue samples collected included heart, liver, lung, kidney, spleen, small intestine, large intestine, lymph nodes, and encephalon. The samples were then stored in 10% buffered formalin, processed for histopathology, and stained with

hematoxylin and eosin (HE). The heart sections of the tissue samples were stained with periodic acid-Schiff (PAS) and Masson's trichrome (MT) for the morphological characterization of the cardiac injury.

The slaughter of 600 (colocar a idade) pigs from an impacted lot at farm B was monitored. The tissue samples included liver, lung and heart, and they were macroscopically examined. Samples from 50 pigs were collected from these organs, and the samples were stored in 10% buffered formalin and refrigerated.

### **Experimental study**

Nine 40-day-old, 15 kg piglets were used in the experimental study. The piglets were divided into three groups: Group 1 (suspected feed farm B), Group 2 (50% suspected feed + 50% control feed) and Group 3 (100% feed control). The animals received their respective diets for 15 days. The pigs in group 1 were fed the suspected feed collected at farm B, the group 2 pigs received a control diet and group 3 receiving half suspected feed and half control feed . The feeds were formulated with corn, soybean meal and commercial premix.

The piglets received food and water *ad libitum*, and they were weighed weekly and monitored daily. All of the pigs were humanely euthanized as required by current legislation under the approval of the UFRGS Ethics and Animal Experimentation Committee (approval protocol number 29467). The carcasses were weighed and necropsied, and multiple tissues, including liver, lung, heart, kidney, spleen, lymph nodes, small intestine, large intestine and brain, were collected and stored in 10% buffered formalin.

The whole heart from each pig was collected and weighed after the blood was drained. The heart weight-to-body weight ratio (HW:BW) was determined (Turk, 1983; Robinson; Robinson, 2016).

### **Chemical and toxicological analyses**

Liver samples were collected from both the necropsied pigs from farm B and the pigs from the experimental study. These samples were then frozen at -20°C to evaluate the levels of vitamin E and selenium. The liver and myocardial samples stored in 10% formalin from piglets of farms B and C, in addition to those from the experimental groups, were used to determine the levels of other minerals. Feed samples from farms A and B were collected for chemical and toxicological analyses.

An aminogram analysis was performed on the feed sample from farm B, and the measurements of the following amino acids were obtained: alanine, arginine, aspartic acid, glycine, isoleucine, leucine, glutamic acid, lysine, cysteine, methionine, phenylalanine, tyrosine, threonine, tryptophan, proline, valine, histidine and serine (Suppl. Table. 1).

### **Molecular analyses**

Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue samples from the myocardium of two inflicted pigs were used for the extraction of DNA<sup>a</sup> and RNA<sup>b</sup> by polymerase chain reaction (PCR)<sup>c</sup> and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)<sup>d</sup> in order to detect major viral agents responsible for the heart lesions in the pigs (Suppl. Table. 2).

## **Results**

### **Spontaneous cases: clinical features and histological characteristics**

The impacted pigs varied in age from 30 to 70 days. Sixty pigs died at farm A, 53 died at farm B, and approximately 80 pigs died at farm C. The clinical signs of acute respiratory failure included dyspnea, cough, fatigue and anorexia, followed by death within days. These clinical signs were consistently reported at all three farms.

The pigs were treated with antibiotics through their water and feed, and the antibiotics were not successful. The mortality rates ranged from 2 to 10% within the farms, which was considered above average for these farms. Pigs from other age categories were not impacted. The feed was analyzed at farms B and C, and the soybean meal exhibited a low-quality standard, as it had a low urea activity index of 0.03 and 0.04 (reference values (RV): 0.05 to 0.2), and the solubility analysis displayed values between 50 and 60% (RV: 70-80%). In all of the studied farms, after the supply of the suspected feed was replaced, mortality ceased, and the pigs with the clinical signs recovered and survived.

During the visits, four piglets at farm A, six at farm B, and four at farm C were necropsied, and similar gross lesions were observed in the piglets. The examination of the abdominal and thoracic cavities revealed severe lesions (Fig 7). There was moderate to severe serous translucent fluid with yellow fibrin strands in the abdominal cavities of the piglets (Fig 2). The liver was markedly larger (Fig 1B), dark, and nutmeg in color, which was mainly visible at the cut surface (Figs 1 and 3).

There was hepatic atrophy in some pigs at farm C, with marked chronic lesions (Fig 2). The spleen was moderately enlarged, and it exhibited blood at the cut surface. The thoracic cavity and the pericardial sac were filled with low to moderate amounts of serous translucent fluid (hydrothorax and hydropericardium). The heart

was enlarged, and it occupied almost the entire sternal surface (Fig 1) while presenting a globular appearance (Fig 4) with severe bilateral ventricular dilation and intraventricular clotted blood (Fig 5). The lungs were not collapsed, and they had a mild to moderate interlobular edema. Table 1 describes the intensity of the main lesions observed.

The macroscopic examination of the pig hearts at farm B at slaughter did not reveal significant lesions. Liver and heart samples were collected from 50 randomly selected animals.

During the histological examination of the myocardium in all of the pigs for the experimental study and natural cases, the myocardium was observed to have microscopic lesions. Cardiomyocyte atrophy was observed in the myocardium as attenuated wavy fibers (Fig 2A), and MT staining revealed edema and the mild deposition of fibrous connective tissues, mainly perivascular.

Additionally, in two pigs from farms A and B, we observed multifocal areas of thrombosis in the myocardium, mild multifocal fibroid degeneration of blood vessel walls, and a mild multifocal infiltration of lymphocytes in the epicardium and between cardiomyocytes. The liver displayed moderate to marked congestion, necrosis and degeneration of the centrilobular hepatocytes (Figs. 2C and 2D). The histologic examination of the lungs revealed moderate interlobular septa edema (Fig 2E) and moderate numbers of hemosiderin laden macrophages (heart failure cells) within the alveolar lumen (Fig. 2F). In one pig at farm A, fibroid degeneration of the vessel walls was also observed in the lymph nodes, and this degeneration was observed in the spleen and brain in two pigs at farm B.

### **Experimental study**

In the experimental study, one piglet from Group 1 exhibited coughing on the 8th day of feed consumption and severe dyspnea on the 13th day of feed consumption. Another piglet displayed signs of diarrhea with orange-stained feces on the 7th day of the experiment. The remaining pigs did not display any clinical signs, and all were euthanized on the 15<sup>th</sup> day of the experiment. At necropsy, the two piglets in group 1 with clinical signs had lesions similar to those found in pigs that died from natural causes.

The necropsy revealed moderate bilateral ventricular dilatation (Fig 6), a mild amount of fluid in the abdominal and thoracic cavity, and a liver with a nutmeg pattern. The evaluation of the heart weight-to-body weight ratio of the two pigs with macroscopic lesions in Group 1 demonstrated a significant difference when compared to the control pigs. The control pigs had an average HW: BW of 0.53%. The two pigs with DCM lesions had average HW: BW values of 0.73 % and 0.86%, respectively.

The histological evaluation revealed that similar alterations to those observed in natural cases occurred. The piglets from the control group and pigs receiving the 50% diet did not display macroscopic or microscopic lesions.

### **Chemical and toxicological analyses**

Selenium values were within the normal range (RV: 0.1 to 2.9 µg/kg) in the analyzed samples of all the pigs for the natural and experimental cases. Vitamin E values in the liver of the pigs both from natural and experimental cases were also

normal (RV: 3.8-10 µg/kg), except for one pig in Group 1, which exhibited a value higher than 10 µg/kg.

All of the piglets in the natural and experimental cases of DCM had high magnesium levels (600-800 µg/kg) in the myocardium compared to the control animals (300-400 µg/kg). The iron levels in the liver were higher in animals from the experimental group (113-120 µg/kg) than in animals in the control group (145-150 µg/kg).

The feed analysis at farms B and C did not detect the following substances: gossypol, monocrotaline and ionophores. Additionally, the mycotoxin levels in the feed were below the toxic threshold (<5 µg/kg for fumonisins and <50 µg/kg for aflatoxin).

### **Molecular analyses**

The heart samples from the pigs subjected to PCR in both the natural and experimental cases were negative for porcine Circovirus type II, Porcine Parvovirus, Influenza A, Enterovirus and Pestivirus.

### **Discussion**

According to the pathological, histopathological, epidemiological, and experimental findings, the condition described in this study can be characterized as congestive heart failure by nutritional DCM in pigs.

The causes of dilated cardiomyopathy in pigs has been linked to poisoning by gossypol, ionophore, antibiotics and fumonisin.<sup>16, 13, 14, 20, 25</sup> These causes have been eliminated in this study by the use of chemical analysis and toxicological tests.

The mineral analysis revealed a higher level of magnesium in the heart samples from piglets with DCM than in the experimental pigs in the control group.

Some studies suggest that high levels of magnesium in the liver and heart are related to the occurrence of cardiac alterations.<sup>10</sup> However, additional studies are needed for further clarification of this relationship in natural conditions. Additionally, high levels of iron were observed in the liver samples of the piglets with DCM. This likely occurred because of congestive heart failure with marked congestion of the viscera.

In our study, the levels of vitamin E and selenium were normal, and the macroscopic and histopathological lesions were different from those observed in Mulberry heart disease cases, which is characterized primarily by hemorrhage and necrosis of the cardiomyocytes.<sup>17, 23</sup>

In two of the studied farms (farms B and C), the soybean meal exhibited poor quality, which was classified by the low urea activity and low solubility. A low solubility indicates that the bran does not have the recommended water content, and it has possibly undergone a process called “over toasting”.<sup>18, 1</sup> The consumption of a low solubility soybean meal by the nursery pigs resulted in decreased digestibility rates and a decrease in lysine availability for the animals, which leads to a reduction in weight gain.<sup>18, 1</sup> However, there are no reports to date that associate the soybean meal with the occurrence of cardiac abnormalities.

The aminogram did not detect any alterations in the total levels of amino acids of the low-solubility soybean meal, but the possibility that these nutrients were absorbed less frequently cannot be excluded. The nutritional value of protein in food does not solely depend on amino acid composition, but it also depends on digestibility and availability, which are factors that were not analyzed in this study.<sup>2</sup>

In the outbreaks, the impacted piglets were in the nursery phase especially, and during this phase, there is a high energy requirement, which leads to a major

change in intestinal morphology caused by modifications in the piglets' diet. External factors such as temperature, humidity, and conditions of the facilities, as well as factors related to diet, can interfere with the intake and utilization of food.<sup>18,1</sup> In this study, the low quality of the feed may have caused the cardiac abnormalities.

When determining the HW:BW of the piglets from the experimental study, one piglet exhibited a heart volume of 0.86%, which is twice the estimated mean value (0.40%). A second pig with more mild injuries exhibited a heart volume of 0.73%. In DCM, an increase in heart volume is macroscopically observed, and the increase in volume includes the dilation of heart chambers, mainly the ventricles, which acquire a rounded shape, a flaccid appearance and a weight 20 to 50% above the normal range.<sup>5, 15</sup>

In this study, dilation was observed in all of the heart chambers, and this observation is similar to that described in dogs and humans.<sup>5, 28, 15</sup> It has been noted that there is a greater dilation of the left ventricle for cats on occasion.<sup>29</sup>

The macroscopic alterations observed in the piglets with nutritional DCM in this study are similar to the alterations found in cases of taurine deficiency in cats, genetic cardiomyopathy in dogs and humans, gossypol poisoning in pigs, as well as ionophore poisoning in cattle and pigs.<sup>5, 28, 29, 12, 15, 16</sup>

The histologic lesions observed for the pig organs in the natural and experimental cases were comparable to congestive heart failure due dilated cardiomyopathy. No histological lesions were observed in the pigs with diarrhea in the experimental study. A pattern of wavy fibers was observed in the hearts of pigs

with DCM. These histopathological lesions are consistent with the pattern of wavy fibers described in DCM for dogs, humans, turkeys, and pigs.<sup>5, 29, 19, 4, 24, 3</sup>

There are a few reports of dilated cardiomyopathy in pigs compared to humans and dogs in which DCM is the main type of diagnosed cardiomyopathy.<sup>27, 7</sup> Several causes of DCM in humans and animals are still unknown. The “round heart disease” in turkeys, has a not well-defined etiopathogenesis, has an unclear cause as well. Additionally, mulberry heart disease, which is an important disease that impacts nursery pigs, does not have a defined etiology.

Further research on swine DCM is necessary because pigs serve as an experimental model in human heart diseases due to similar anatomical and functional features of the heart.<sup>26</sup>

Macroscopic lesions, clinical history, laboratory tests, and the results of the experimental study demonstrated that the death outbreaks in growing pigs are caused by nutritionally induced dilated cardiomyopathy. This study suggests that this condition is related to the consumption of feed that is formulated with a low-quality soybean meal. However, we still do not know the specific cause. During this study, we discarded the following main causes of DCM in pigs: ionospheres or gossypol intoxications, possible infectious causes and toxic causes. There were no significant changes in the levels of the primary minerals and vitamins supplemented in the experimental diets

### **Acknowledgments**

We thank Dr. Kent Schwartz, Dr. Scott Radke and Dr. Steve Ensley of Iowa State University for performing the GC/MS test and Professor Fernando Rosado Spilki of

Feevale University for performing the PCR test for Enterovirus. The authors thank all colleagues and former colleagues who have helped in some way.

**Declaration of Conflicting Interests** – The authors declared no conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publications of this article.

**Funding** – The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq (Process number: 406416/2016-8).

### References

1. Berthol TM et al. Proteínas da Soja Processadas de Diferentes Modos em Dietas para Desmame de Leitões [Soybean Proteins Processed by Different Forms in Diets for Weaned Piglets]. Rev. bras. zootec 2001; **30**:150-157. Portuguese.
2. Bünzen S et al. Digestibilidade do fósforo de alimentos de origem vegetal determinada com suínos em crescimento e terminação [Phosphorus digestibility of food of plant origin determined with growing and finishing pigs]. Rev. bras de zootec 2008, **37**: 1236-1242. Portuguese.
3. Collins, DE et al. Spontaneous Dilated Cardiomyopathy and Right- Sided Heart Failure as a Differential Diagnosis for Hepatosis Dietetica in a Production Pig. Comp Med 2015; **65**:327-332.
4. Czarnecki CM. Cardiomyopathy in turkeys. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol 1984; **77**:591-8.

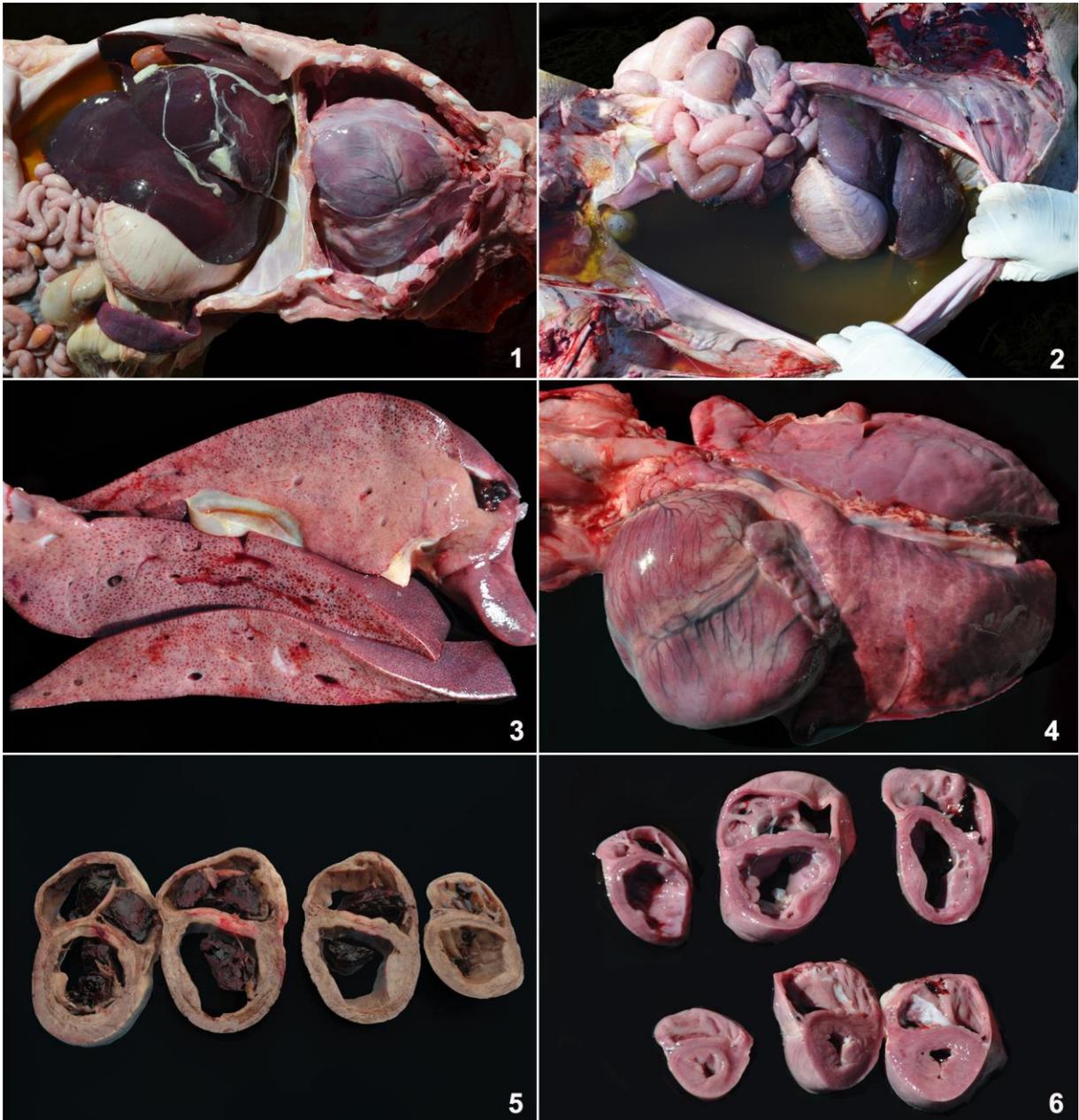
5. Edwards W.D. Cardiomyopathies. Humm Path 1987; **18**: 625-635.
6. Ehlers B et al. Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. Virus Genes 1999; **18**:211–220
7. Elliott P et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. Eur. Heart J 2008; **29**:270–276.
8. Harvey PA, Leinwand LA. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. J.Cell.Biol **201**; 194–365.
9. Keene, B.W. et al. Myocardial L-carnitine deficiency in a family of dogs with dilated cardiomyopathy. J Am Vet Med Assoc 1994; **198**:647-650.
10. Korpela H. Hypothesis: increased calcium and decreased magnesium in heart muscle and liver of pigs dying suddenly of microangiopathy (mulberry heart disease): an animal model for the study of oxidative damage. 1991 J Am Coll Nutr 1991;**10**:127-
11. Krehl L. Beitrag zur Kenntniss der idiopathischen Hertzmuskelkrankungen. [Contribution to the knowledge of the idiopathic hermetic muscle disease]. Arch Klin Med 1891; **48**:414-31. (Dtsch.).
12. Lobo LL, Pereira R. Cardiomiopatia dilatada canina [Canine Dilated Cardiomyopathy]. Rev Portu de Ciên. Vet 2002; **97**:153-159.(Portuguese)
13. Lohanachan et al. Cardiovascular and Hematopoietic Systems. In: Zimmerman, J.J, Karriker, L.A, Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. Diseases of swine, 10<sup>th</sup> edition, Iowa, Wiley-Blackwell, 2012:189-193.

14. Miller M, Van Vleet JF et al. Cardiovascular system and lymphatic vessels. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. Pathologic basis of veterinary disease. 5th ed, Mosby Elsevier, St Louis, Missouri, 2012:569-572.
15. O'Grady M.R. & O'Sullivan M.L. 2004. Dilated cardiomyopathy: an update. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract*; 2004, **34**:1187–1207.
16. Nogueira VA, França TN et al. Intoxicação por antibióticos ionóforos em animais[Intoxication by ionophore antibiotics in animals]. *Pesq. Vet. Bras* 2009; **29**:191-197. (Portuguese).
17. Pallarés F.J;Yaeger M.J; Janke B.H;Fernández G; Halbur PG.Vitamin E and selenium concentrations in livers of pigs diagnosed with mulberry heart disease. *J. Vet. Diagn. Invest*; **14**:412-4, 2002.
18. Parsons CM et al. Soybean protein solubility in potassium hydroxide: na in vitro test of in vivo protein quality. *J. Anim. Sci* 1991; **69**:2918-2924.
19. Radu et al. Histological and immunohistochemical changes of the myocardium indilated cardiomyopathy 2012. *Rom J Morphol Embryol* 2012, **53**:269–275.
20. Ramirez A, Herd E. In: Zimmerman, J.J, Karriker, L.A, Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. Diseases of swine, 10<sup>th</sup> edition, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012:5-
21. Richardson P et al. Report of the 1995 World Health Organization/ International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 1996; **93**: 841-842.
22. Robinson WF, Robinson NA. Cardiovascular. System. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. Pathology of Domestic Animals. Vol. 1-3, 6th ed, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri.2016:44-50.

23. Shen H et al. Vitamin E and selenium levels are within normal range in pigs diagnosed with mulberry heart disease and evidence for viral involvement in the syndrome is lacking. *Transbound. Emerg. Dis*; **58**:483-91, 2011.
24. Stenzel T, Tykalowski B et al. Cardiovascular system diseases in turkeys. *Pol J Vet Sci* 2008; 11:245–50.
25. Sobestiansky J. et al. Intoxicação por minerais, produtos químicos, plantas e gases. [Intoxication by minerals, chemicals, plants and gases]. In: Sobestiansky J, Barcellos D. (ed.). *Doenças dos Suínos*, Goiânia: Cênone Editorial, 2012:553-580 (Portuguese).
26. Swindle MM, Makin A et al. Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. *Vet Pathol* 2012; 2:344-356.
27. Sisson D, O'Grady MR. et al. Myocardial diseases of dog. In: *Textbook of canine and feline cardiology. Principles and clinical practice*, 2ª edição. Editores: Sisson, Fox, Moise. W.B. Saunders Company (Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo), 1999: 581-620.
28. Sisson D, Thomas WP. Myocardial disorders. In: Ettinger, S.J. ed. *Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult* 4 ed. São Paulo: WB Saunders, 1995: 1406-1410.
29. Tidholm A, Jönsson L. Histologic characterization of canine dilated cardiomyopathy. *Vet Path* 2005; 1:1-8.
30. Turk JR. Necropsy canine heart: A simple technique for quantifying ventricular hypertrophy and valvular alterations. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 1983; 5:905–910.

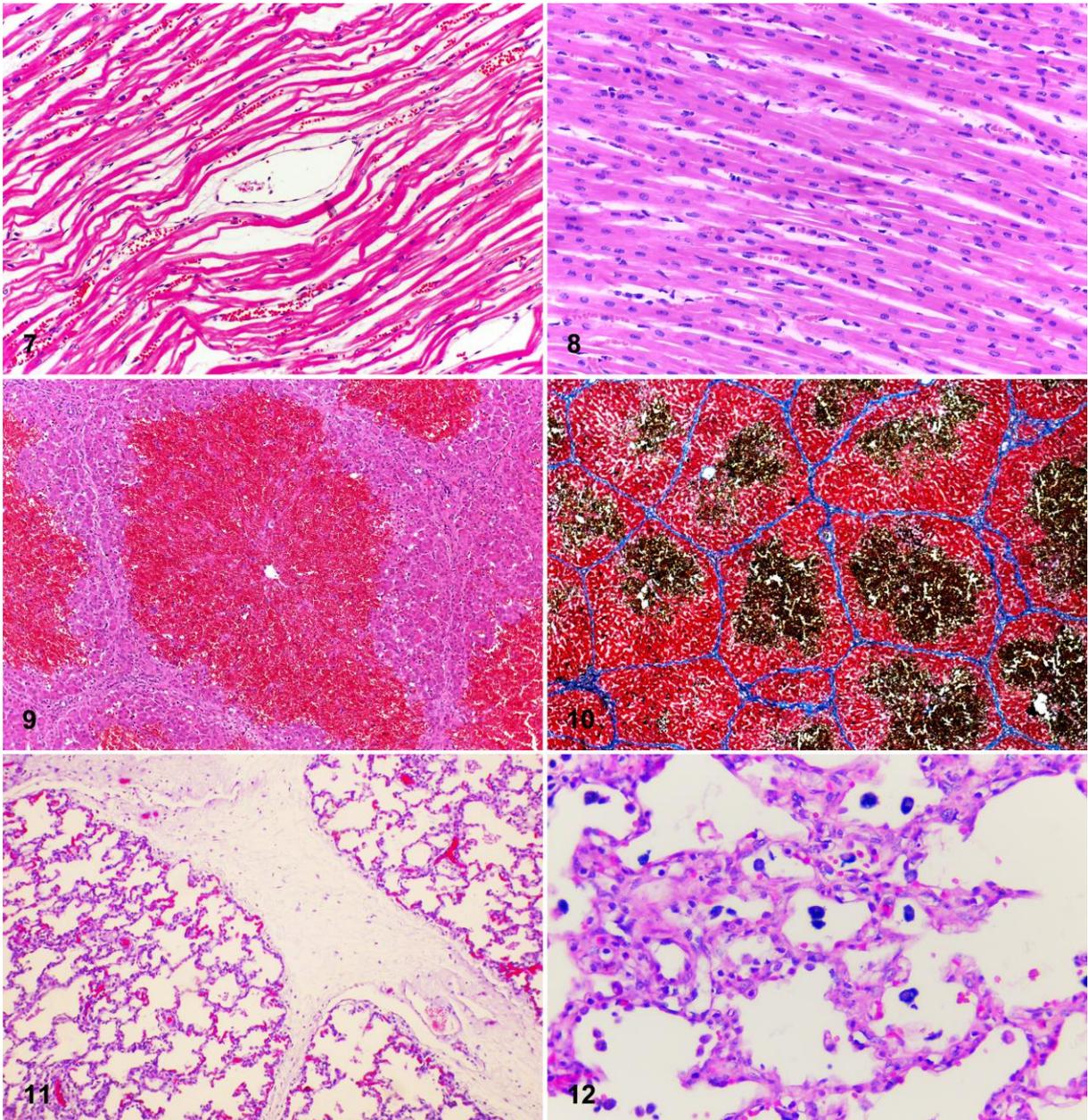
31. Vecchia A et al. First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil, *Braz J Biol*, 2012;72:323-329.
32. Vilcek S, Nettleton P et al. Remarkable cross reaction of pan-pestivirus PCR primers with poliovirus genome. *J.Virol* 2003; 114:167–170.

## Figures and Legends



**Figures 1-6.** Gross lesions of dilated cardiomyopathy in pigs. 1. Figure. The heart is markedly increased in volume and occupies most of the thoracic cavity. In the abdominal cavity, there are moderate ascites with fibrin filaments and an enlarged and diffused red liver. 2. Figure. Moderate to severe ascites and moderate atrophy of the liver. 3. Figure. Nutmeg liver, cut surface. 4. Figure. Heart markedly increased in volume. 5. Figure. Transversal sections of the heart displaying severe bilateral

ventricular dilatation and an intraventricular blood clot. 6. Figure. Experimental study. Observed transversal sections of a pig heart with dilated cardiomyopathy (above) compared to a heart of a normal control pig.



**Figure 7-12.** Histologic lesions in tissue from a pig with dilated cardiomyopathy. Figure 7. Heart of a pig with DCM, which shows cardiomyocyte atrophy evidenced by attenuated wavy fibers. H&E, obj. 10x. Figure 8. Heart of a control pig. Figure 9.

Moderate to marked hepatic congestion, degeneration and necrosis of the centrilobular hepatocytes (nutmeg liver). H&E, obj. 20x. Figure 10. Nutmeg liver in Masson's Trichrome stain, obj. 10x. Figure 11. Moderate interlobular pulmonary edema. H&E obj.10x. Figure 12. Lung. Moderate numbers of macrophages with intracytoplasmic hemosiderin (heart failure cells). Perl's Prussian blue stain, obj.40x

## **4.2 Artigo 2**

Neste item é apresentado o artigo 2 intitulado "Cardiomiopatia dilatada em suínos: caracterização histológica, histoquímica e imuno-histoquímica", que será submetido a revista Pesquisa Veterinária Brasileira. .

## **Cardiomiopatia dilatada em suínos: caracterização histológica, histoquímica e imuno-histoquímica<sup>1</sup>**

Raquel Aparecida Sales da Cruz<sup>2</sup>, Matheus de Oliveira Reis <sup>2</sup>, Marina Paula Lorenzetti<sup>2</sup>, Fernando Soares da Silva<sup>2</sup>, Daniele Mariath Bassuino<sup>2</sup>, Fabiana Marques Boabaid<sup>3</sup>, Saulo Petinatti Pavarini, David Driemeier<sup>2\*</sup>.

**ABSTRACT.**- Cruz R.A.S., Reis M.O., Lorenzetti M.P., Silva F.S., Bassuino D.M., Boabaid F.M., Pavarini S.P., Driemeier D. [**Dilated cardiomyopathy in swine: histological characterization, histochemistry and immunohistochemistry**]. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00- 00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail:davetpat@ufrgs.br

Dilated cardiomyopathy (CMD) is a myocardial disease characterized by cardiac dilation and failure of ventricular function rarely diagnosed in pigs. This study characterized the main histological, histochemical and immunohistochemical changes seen in pig hearts with CMD of nutritional origin and compared them with control pigs. Six pigs with CMD and 2 control pigs without cardiac alterations were used. The 10% formalin-fixed heart samples were sectioned in six-part transverse and longitudinal sections: right atrium (AD), left atrium (AE), right ventricle (RV), left ventricle (LV), interventricular septum and papillary muscle (MP). Samples were stained with hematoxylin and eosin, masson and picosirius trichrome plus anti-vimentin, anti-desmin and anti-ANP immunohistochemistry. The main cardiac lesions observed in pig hearts with CMD were atrophy of cardiomyocytes, sarcoplasmic vacuolization, rupture of myofibers and fibers with wavy pattern. The anti-desmin and anti-vimentin markers were less intense in areas with histopathological lesions, evidencing a loss of proteins and decreased irrigation in injured areas. The anti-ANP marking occurred in atria of all samples analyzed and was characterized as being granular and perinuclear, being more intense in atrial cardiomyocytes of control animals. In the ventricles the marking was discrete and very variable. The CMD cardiac lesions in pigs are similar to those observed in other species. Anti-desmin immunohistochemistry should be used as an important diagnostic tool for CMD in pigs.

INDEX TERMS: myocardial diseases, heart failure, piglets, histopathology.

**RESUMO.**-Cardiomiopatia dilatada (CMD) é uma doença miocárdica caracterizada por dilatação cardíaca e falha na função ventricular raramente diagnosticada em suínos. Este estudo caracterizou as principais alterações histológicas, histoquímicas e imuno-histoquímicas visualizadas em corações de suínos com

---

<sup>1</sup> Recebido em ..... 2017.

Aceito para publicação em .....

<sup>2</sup> Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil \* Autor para correspondência: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

<sup>3</sup> Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá, Rua Itália s/n, Jardim Europa, CEP: 78065-480, Cuiabá, MT, Brasil.

CMD de origem nutricional e as comparou com suínos controles. Foram incluídos 6 suínos com CMD e 2 suínos controles sem alterações cardíacas. As amostras de coração fixadas em formalina a 10% foram seccionadas em cortes transversais e longitudinais de seis porções: átrio direito (AD), átrio esquerdo (AE), ventrículo direito (VD), ventrículo esquerdo (VE), septo interventricular (SIV) e músculo papilar (MP). As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina, tricrômico de masson e picrossírius além das imunohistoquímicas anti-vimentina, anti-desmina e anti-ANP. As principais lesões cardíacas observadas em corações de suínos com CMD foram atrofia de cardiomiócitos, vacuolização sarcoplasmática, ruptura de miofibras e fibras com padrão ondulado. As marcações anti-desmina e anti-vimentina foram menos intensas em áreas com lesões histopatológicas, evidenciando uma perda de proteínas e diminuição de irrigação em áreas lesionadas. A marcação anti-ANP ocorreu em átrios de todas as amostras analisadas e caracterizou-se por ser granular e perinuclear, sendo mais intensa em cardiomiócitos atriais de animais controles. Nos ventrículos a marcação foi discreta e muito variável. As lesões cardíacas de CMD em suínos são semelhantes às observadas em outras espécies. A imunohistoquímica anti-desmina deve ser utilizada como uma importante ferramenta diagnóstica para CMD em suínos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: doenças do miocárdio, insuficiência cardíaca, leitões, histopatologia.

## INTRODUÇÃO

Cardiomiopatia dilatada (CMD) é uma doença miocárdica caracterizada por dilatação cardíaca e redução da contratilidade da parede do ventrículo esquerdo ou de ambos os ventrículos, sendo a etiologia de origem genética ou desconhecida (O'Grady & O'Sullivan 2004).

Em animais a CMD é comumente relatada em cães de raças definidas de porte grande a gigante, especialmente Dobermann (Lobo & Pereira 2002). Em gatos é associada principalmente à deficiência de taurina, mas, com o avanço nos estudos sobre nutrição animal e suplementação de taurina na dieta de gatos, houve um declínio significativo no número de casos, que se tornaram raros (Sisson & Thomas 1995). Em suínos há relatos de CMD associada à intoxicação por gossipol, antibióticos ionóforos, estresse e causas nutricionais desconhecidas (Smith 1957, Nogueira et al. 2009, Ensley & Osweiler 2012, Collins et al. 2015). Há, ainda, relatos de cardiomiopatia dilatada hereditária em bovinos produtos do cruzamento entre as raças Simental e Holandesa de pelagem vermelha (Nart et al. 2004, Buczinski et al. 2010, Horiuchi et al. 2015). Na criação comercial de perus há diversos relatos de cardiomiopatia dilatada espontânea, conhecida como “doença do coração redondo dos perus”, cuja etiopatogênese ficou indefinida durante muitos anos, mas alguns estudos indicam a identificação de alguns genes possivelmente ligados a CMD nesta espécie (Czarnecki 1984, Reed et al. 2007, Stenzel et al. 2008).

Na CMD o miocárdio encontra-se enfraquecido e dilatado e não consegue bombear o sangue de forma eficiente para o corpo (Lobo & Pereira 2002). Macroscopicamente o coração tem um significativo aumento de volume, com dilatação de câmaras cardíacas, principalmente dos ventrículos, que adquirem forma globosa, aspecto flácido e peso 20 a 50% acima do normal (Edwards 1987, Sisson & Thomas 1995, Tidholm & Jönsson 1997).

As principais alterações microscópicas observadas nos corações com CMD em humanos e animais são cardiomiócitos alongados e com vacuolização sarcoplasmática, devidos à perda de miofibrilas contráteis. Os núcleos estão hipertrofiados por aumento na síntese de DNA, podendo apresentar aspecto polipoide, hipercromático e com cromatina heterogênea. Pode se observar também infiltrado intersticial de macrófagos e linfócitos, além de deposição de tecido conjuntivo fibroso, principalmente perivascular. Em alguns casos observam-se também aterosclerose e trombose (Edwards 1987, Davies 2000, Radu et al.

2012). Em cães, espécie animal em que a doença é mais estudada, descrevem-se ainda dois padrões distintos de lesões: degeneração de cardiomiócitos e infiltração gordurosa observadas principalmente em cães das raças Boxer, Dobermann Pinscher; e um padrão de fibras onduladas, visualizado em cães em raças gigantes, grandes e médias (Tidholm & Jönsson 2005). Em suínos, perus e bovinos há relatos de lesões macroscópicas e histológicas semelhantes às observadas em humanos (Nogueira et al. 2009, Ensley & Osweiler 2012, Collins et al. 2015, Cruz et al. 2017).

Na medicina veterinária utilizam-se diversos marcadores clínicos, funcionais e bioquímicos na tentativa de estabelecer diagnóstico e prognóstico de CMD e insuficiência cardíaca (IC), especialmente em cães. Os principais marcadores bioquímicos utilizados no diagnóstico e estabelecimento de prognóstico clínico em cães com cardiomiopatia são os peptídeos natriuréticos atriais (ANP) e cerebrais (BNP) (Yonezawa et al. 2010). Adicionalmente, diversos estudos ainda estão sendo desenvolvidos na tentativa de estabelecer padrões histológicos que auxiliem no estabelecimento do prognóstico e do diagnóstico. Em alguns casos de CMD, tanto humanos quanto animais morrem subitamente, sem sinais clínicos prévios. Nestes casos o exame anatomopatológico é fundamental no diagnóstico (Lobo & Pereira 2002, Dukes-McEwan et al. 2003, Nunes et al. 2006, Radu et al. 2012). A CMD é a principal causa de IC em humanos e pesquisas sobre a CMD em animais são utilizadas como modelo para a espécie humana (Davies 2000, Jefferies & Towbin 2010, Hershberger et al. 2013).

O objetivo deste trabalho é descrever a caracterização morfológica e imuno-histoquímica de lesões cardíacas em suínos com cardiomiopatia dilatada de origem nutricional, utilizando amostras de coração de suínos com e sem CMD.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de coração de seis suínos com CMD de origem nutricional (suínos 1, 2, 3, 4, 5 e 6) e dois (7 e 8) suínos controle, sem CMD. As amostras dos corações de suínos com CMD foram provenientes de estudos prévios (Cruz et al 2017). As amostras de coração foram fixadas em formalina a 10% tamponada, com avaliação de seis áreas cardíacas: parede de átrio direito (AD), átrio esquerdo (AE), ventrículo direito (VD), ventrículo esquerdo (VE), septo interventricular (SIV) e músculo papilar (MP). As amostras foram processadas rotineiramente para histologia, seccionadas a 3 µm de espessura e confeccionadas lâminas histológicas, que foram submetidas às colorações de Hematoxilina e eosina (HE), Tricrômico de Masson (TM) e Picrosírius (PS). Para o estudo imuno-histoquímico foram utilizados cortes histológicos transversais e longitudinais de 3 µm, das seis áreas cardíacas, que foram aplicados em lâminas histológicas silanizadas e empregados os anticorpos primários anti-desmina, anti-vimentina e anti-peptídeos natriuréticos atriais (ANP). As técnicas e anticorpos utilizados estão listados no Quadro 1. Para a imuno-histoquímica anti-ANP foram utilizadas apenas amostras de átrios e ventrículos.

## RESULTADOS

Nos suínos com CMD observaram-se alterações histológicas principalmente em cardiomiócitos e, com menos frequência, em espaços intersticiais. As alterações mais frequentes foram atrofia de cardiomiócitos e vacuolização sarcoplasmática, observadas em todos os suínos afetados e na maioria das áreas avaliadas (Quadro 2). Atrofia de cardiomiócitos era caracterizada por núcleos distorcidos, hipercromáticos e cromatina condensada (Fig 1A e 1B). Esta alteração era evidente principalmente em SI, onde os cardiomiócitos atrofiados adquiriam um padrão de miofibras onduladas, especialmente em áreas centrais do miocárdio de SI e ventrículos dos suínos com CMD (Fig 1C e 1D). Em suínos controle foi possível observar miofibras com padrão ondulado, principalmente, em porções do VD e em áreas próximas ao epicárdio. Em ventrículo esquerdo observou-se esta alteração com menor frequência e intensidade. Vacuolização sarcoplasmática ocorreu especialmente em cardiomiócitos de paredes ventriculares. Esta alteração tinha maior intensidade em áreas próximas a vasos com trombose e em menor intensidade nos

SIV e MP, sendo essa alteração mais acuradamente observada em cortes transversais. Nas colorações especiais de TM e PS evidenciou-se deposição discreta de tecido conjuntivo intersticial e perivascular, principalmente nos ventrículos de suínos com CMD e sem CMD (Fig 2C e 2D). Em apenas um suíno (6) visualizou-se área focal de esclerose no músculo papilar do VE (Quadro 2) (Fig 2A e 2B). Em quatro suínos (1, 2, 3 e 4) foi observado infiltrado linfocítico multifocal discreto no ventrículo. Em todos os casos notou-se ruptura multifocal de miofibras, com maior intensidade em miocárdio ventricular e áreas próximas a injúrias vasculares. Visualizou-se áreas de trombose multifocais variando de discretas a moderadas em ventrículos de quatro suínos (1, 2, 5 e 6). Nos átrios não foram visualizadas alterações histológicas (Quadro 2).

A marcação anti-desmina foi difusa acentuada em cardiomiócitos de suínos controles (Fig. 3 A e 3B). Já em suínos com CMD notou-se uma imunomarcção anti-desmina discreta ou inexistente em áreas com lesões, como vacuolização sarcoplasmática e ruptura de miofibras (Fig. 3 C e 3D). Visualizou-se uma marcação anti-vimentina em vasos sanguíneos mais discreta em coração de suínos com CMD quando comparado com os suínos controles, especialmente em áreas com lesões histopatológicas. Houve ainda discreta marcação anti-vimentina em tecido conjuntivo perivascular em todos os suínos. O anticorpo anti-ANP marcou cardiomiócitos, principalmente dos átrios, em todos os suínos com CMD e nos suínos controle. Nos suínos com CMD o padrão de marcação atrial foi caracterizado por ser granular, perinuclear multifocal discreto em cardiomiócitos, especialmente os próximos ao endocárdio (Fig 4A e 4B). Em suínos controles a marcação anti-ANP em cardiomiócitos atriais foi difusa moderada e com padrão semelhante ao observado nos casos de CMD (Fig 4C e 4D). Nos ventrículos de dois suínos (2 e 4) com CMD a marcação foi multifocal discreta em cardiomiócitos próximos ao endocárdio (Fig 4E). Houve ainda intensa marcação granular e perinuclear em fibras de Purkinje em ventrículos de suínos com CMD e suínos controles (Fig 4F).

## DISCUSSÃO

Observaram-se lesões histopatológicas predominantemente em cardiomiócitos de suínos com CMD. Estas lesões são compatíveis com as descritas em outras espécies, como humanos, cães, gatos e perus (Edwards 1987, Davies 2000, Lobo & Pereira 2002, Tidholm & Jönsson 2005, Stenzel et al. 2008, Radu et al. 2012). Collins et al. (2015) observaram lesões histológicas semelhantes em um suíno. Neste estudo não foi observado o padrão de degeneração de cardiomiócitos com infiltração gordurosa intersticial descrito em cães, mas foi observado um padrão de fibras onduladas em todos os casos, especialmente em cortes de septo interventricular. As miofibras cardíacas adquirem um padrão ondulado devido à atrofia em resposta à perda de contratilidade e em áreas com lesões de isquêmicas nos casos de CMD (Tidholm & Jönsson 2005). A visualização desta alteração com maior frequência em SI é provavelmente pela disposição longitudinal das fibras. Essa alteração foi também visualizada também em ventrículos de suínos controle, sugerindo que isso ocorre no coração de suínos normais devida à expansão cardíaca durante a propulsão do sangue para o organismo, no entanto, em suínos com CMD esta alteração é mais acentuada e está associada a atrofia de cardiomiócitos.

Em humanos a fibrose cardíaca é descrita como umas das principais lesões histológicas observadas na CMD e é até utilizada como um fator de prognóstico; nos casos do estudo a fibrose não foi significativa, apenas um suíno apresentou área focal sugestiva de miocardiosclerose. Isso se deve, possivelmente, ao tempo de evolução das lesões; em humanos as lesões são crônicas e, frequentemente, são casos de cardiomiopatia genética ou em casos de alcoolismo (Edwards 1987, Davies et al. 2000, Radu et al. 2012). Neste estudo, os casos são de cardiomiopatia dilatada de origem nutricional e que tiveram, em casos espontâneos, evolução da lesão de 30 a 60 dias. No entanto, em todos os suínos com CMD observou-se discreta deposição de delgadas camadas de tecido conjuntivo intersticial e perivascular, demonstrando

um processo inicial de remodelação, o que já foi descrito em humanos (Marijianowski et al. 1995, Radu et al. 2012). Deposição de delgadas camadas de tecido conjuntivo foi também observada em suínos controle, porém com intensidade menor em relação aos casos de CMD, sugerindo que, nestes casos, é uma alteração fisiológica.

A intensidade das alterações microscópicas no miocárdio foi variável entre os suínos e mesmo entre as diferentes áreas do miocárdio, o que já foi demonstrado em análises histológicas de coração humano (Hughes & McKenna 2005). Em humanos é descrito que as alterações histológicas associadas à cardiomiopatia dilatada não são específicas e nem todas estão presentes simultaneamente em todos os casos, o que foi observado nos casos estudados e é descrito para outras espécies animais (Radu et al. 2012, Hughes & McKenna 2005, Robinson & Robinson 2016).

A imunomarcção para desmina em corações de suínos com CMD foi reduzida em áreas com lesões histológicas mais acentuadas, especialmente de hipertrofia e vacuolização de cardiomiócitos. Este achado é semelhante ao encontrado por Radu et al. (2012) em humanos e demonstra a perda de proteínas contráteis dos cardiomiócitos, o que é, provavelmente, a razão para diminuição de contratilidade cardíaca.

A marcação para vimentina em vasos sanguíneos, em tecido conjuntivo intersticial e perivascular é semelhante ao que é observado em humanos e outras espécies (Davies 2000, Tidholm & Jönsson 2005, Radu et al. 2012). A imunomarcção reduzida em áreas de lesão é semelhante ao que já foi descrito em humanos, indicando que um quadro de isquemia seja também responsável pelas lesões. Na medicina humana a vimentina é utilizada como um marcador de diagnóstico para miocardioesclerose, já que a fibrose é a lesão histológica predominante nos casos de CMD humana (Davies 2000, Radu et al. 2012). Nos casos avaliados a fibrose não foi uma alteração importante.

A dosagem de peptídeos natriuréticos no soro é frequentemente utilizada para o estabelecimento do diagnóstico e do prognóstico de alterações de volume cardíaco em humanos e animais (Yonezawa et al. 2010, Sergeeva & Christoffels 2013, Oremus et al. 2014). Diversos autores descrevem a IHQ anti-ANP como uma ferramenta de diagnóstico histopatológico para cardiomiopatias (Takemura et al. 1989, Hasegawa et al. 1991, Colbatzky et al. 1993, Luchner et al. 2001, Biondo et al. 2003). Neste estudo houve marcação para ANP em cardiomiócitos atriais próximos ao endocárdio em suínos com CMD e em controles, semelhante ao que é descrito em coelhos, suínos, gatos e cães, com imunomarcção restrita a cardiomiócitos atriais em animais saudáveis (Takemura et al. 1989, Hasegawa et al. 1991, Colbatzky et al. 1993, Luchner et al. 2001, Biondo et al. 2003) e diferente do que ocorre em ratos, nos quais é descrita marcação em cardiomiócitos atriais e ventriculares em animais saudáveis (Raizada et al. 2001). Nos suínos com CMD houve marcação menos intensa em cardiomiócitos atriais quando comparados com os controles. Em apenas dois suínos com CMD houve marcação em cardiomiócitos ventriculares. É também descrita marcação ventricular variável em cães, gatos e humanos (Takemura et al. 1989, Colbatzky et al. 1993, Biondo et al. 2003). Colbatzky et al. (1993) consideraram que a IHQ anti-ANP para ser utilizada como um marcador histológico requer novas pesquisas e resultados mais convincentes.

## CONCLUSÕES

As principais alterações histológicas que caracterizaram a CMD em suínos ocorreram em cardiomiócitos, com atrofia, padrão ondulado, vacuolização sarcoplasmática e ruptura. O padrão de fibras onduladas foi observado especialmente em septo interventricular. Quando essa alteração era observada apenas em miofibras próximas ao epicárdio em ventrículos de suínos foi considerada uma alteração fisiológica. A fibrose cardíaca foi pouco observada em suínos com CMD, demonstrando não ser um achado importante para definir diagnóstico e prognóstico nestes casos.

A imuno-histoquímica para desmina foi uma importante ferramenta no diagnóstico histológico de CMD em suínos. A imunorreatividade para ANP em átrios foi mais intensa em cardiomiócitos de suínos controle em relação aos suínos com CMD.

## REFERÊNCIAS

- Biondo A.W., Ehrhart E.J., Sisson D.D., Bulmer B.J., De Moraes H.S.A. & Solter P.F. 2003. Immunohistochemistry of atrial and brain natriuretic peptides in control cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Vet. Pathol.* 40:501–506.
- Buczinski S., Rezakhani A. & Boerboom D. 2010. Review heart disease in cattle: Diagnosis, therapeutic approaches and prognosis. *Vet. J.* 184:258–263.
- Collins D.E., Eaton K.A. & Hoenerhoff M.J. 2015. Spontaneous dilated cardiomyopathy and right-sided heart failure as a differential diagnosis for hepatitis dietetica in a production pig. *Comp. Med.* 65:327–332.
- Colbatzky F., Vollmar A., Monch U. & Hermanns W. 1993. Synthesis and distribution of atrial natriuretic peptide (ANP) in hearts from normal dogs and those with cardiac abnormalities. *J. Comp. Pathol.* 108:149–163.
- Czarnecki C.M. 1984. Cardiomyopathy in turkeys. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 77:591–8.
- Cruz et al 2017. Artigo 1. Outbreaks of dilated cardiomyopathy in growing pigs in Brazil.
- Davies M.J. 2000. The cardiomyopathies: an overview. *Heart.* 83:469–474.
- Dukes-McEwan J., Borgarelli M., Tidholm A., Vollmar A.C. & Häggström J. 2003. Proposed guidelines for the diagnosis of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Vet. Cardiol.* 5:7–19.
- Edwards W.D. 1987. Cardiomyopathies. *Humm. Path.* 18: 625–635.
- Ensley S.V. & Osweiler G.D. 2012. Toxic minerals, chemicals, plants and gases. p-953-967. In: Zimmerman L., Karriker A.R., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. (Ed). *Diseases of swine*. 10<sup>th</sup> ed. Wiley-Blackwell, Iowa.
- Hasegawa K., Fujiwara H., Itoh H., Nakao K., Fujiwara T., Imura H. & Kawai C. 1991. Light and electron microscopic localization of brain natriuretic peptide in relation to atrial natriuretic peptide in porcine atrium. Immunohistochemical study using specific monoclonal antibodies. *Circulation.* 84:1203–1209.
- Hershberger R.E., Dale J. & Hedges M.A. 2013. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat. Rev. Cardiol.* 10:531–547.
- Horiuchi N., Kumagai D., Matsumoto K., Inokuma H., Furuoka H. & Kobayashi Y. 2015. Detection of the nonsense mutation of OPA3 gene in Holstein Friesian cattle with dilated cardiomyopathy in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 77: 1281–1283.
- Hughes S.E. & McKenna W.J. 2005. New insights into the pathology of inherited cardiomyopathy. *Heart.* 91:257–264.
- Jefferies J.L. & Towbin J.A. 2010. Dilated cardiomyopathy. *Lancet.* 375:752–762.
- Lobo L.L. & Pereira R. 2002. Cardiomiopatia dilatada canina. *Rev. Port. Cienc. Vet.* 97:153-159.
- Luchner A., Muders F., Dietl O., Friedrich E., Blumberg F., Protter AA., Riegger GA. & Elsner D. 2001. Differential expression of cardiac ANP and BNP in a rabbit model of progressive left ventricular dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 51:601–607.

- Marijianowski M.M., Teeling P., Mann J. & Becker A.E. 1995. Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment. *J. Am. Coll. Cardiol.* 25:1263-1272.
- Nart P., Thompson H., Barrett D.C., Armstrong S.C. & McPhaden A.R. 2004. Clinical and pathological features of dilated cardiomyopathy in Holstein-Friesian cattle. *Vet. Rec.* 155:355-361.
- Nogueira V.A, França T.N. & Peixoto P.V. 2009. Intoxicação por antibióticos ionóforos em animais. *Pesq. Vet. Bras.* 29:191-197.
- Nunes V.L., Ramires F.J.A., Pimentel W.S., Fernandes F., Ianni B.M. & Mady C. 2006. O Papel do acúmulo de colágeno no interstício miocárdico na sobrevida dos pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática e chagásica. *Arq. Bras. Cardiol.* 87:757-762.
- O'Grady M.R. & O'Sullivan M.L. 2004. Dilated cardiomyopathy: an update. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.* 34:1187-1207.
- Oremus M., Don-Wauchope A., McKelvie R., Santaguida P.L., Hill S., Balion C., Booth R., Brown, J.A., Ali U., Bustamam A., Sohel N. & Raina P. 2014. BNP and NT-proBNP as prognostic markers in persons with chronic stable heart failure. *Heart Fail. Rev.* 19:471-505.
- Radu R.I., Bold A., Pop O.T., Mălăescu D.G., Gheorghisor I. & Mogoantă L. 2012. Histological and immunohistochemical changes of the myocardium in dilated cardiomyopathy Rom. *J. Morphol. Embryol.* 53:269-275.
- Raizada V., Thakore K., Luo W. & McGuire P.G. 2001. Cardiac chamber-specific alterations of ANP and BNP expression with advancing age and with systemic hypertension. *Mol. Cell. Biochem.* 216:137-140.
- Reed K.M., Mendoza K.M., Hu G.R., Sullivan L.R., Grace M.W., Chaves L.D. & Kooyman DL. 2007. Genomic analysis of genetic markers associated with inherited cardiomyopathy (round heart disease) in the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Anim. Genet.* 38:211-217.
- Robinson W.F & Robinson N.A. 2016. Cardiovascular System. p-44-50 In: Maxie M.G. (Ed.) Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 6<sup>th</sup> ed, Saunders Elsevier, St. Louis.
- Sergeeva I.A. & Christoffels V.M. 2013. Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1832:2403-2413.
- Sisson D.D. & Thomas W.P. 1995. Afecções do miocárdio. p. 1406-1410. In: Ettinger S.J. (Ed.) Tratado de Medicina Interna Veterinária 4<sup>a</sup>. ed. Saunders, São Paulo.
- Smith H.A. 1957. The pathology of gossypol poisoning. *Am. J. Pathol.* 33:353-365.
- Stenzel T., Tykalowski B. & Koncicki A. 2008. Cardiovascular system diseases in turkeys. *Pol. J. Vet. Sci.* 11:245-50.
- Takemura G., Fujiwara H., Mukoyama M., Saito Y., Matsuda M., Kawamura A., Ishida M., Kida M., Uegaito T. & Nakao K. 1989. Immunohistochemical localization and semiquantification of atrial natriuretic polypeptide (ANP) in formalin-fixed-paraffin-embedded normal human hearts - comparative study with radioimmunoassay. *Jpn. Circ J.* 53:686-694.
- Tidholm A. & Jönsson L.A. 1997. A retrospective study of canine dilated cardiomyopathy (189 cases). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 33:544-550.
- Tidholm A. & Jönsson L.A. 2005. Histologic characterization of canine dilated cardiomyopathy. *Vet. Pathol.* 42:1-8.
- Yonezawa L.A., Silveira V.F., Machado L.P. & Kohayagawa A. 2010. Marcadores cardíacos na medicina veterinária. *Cienc. Rural.* 40:1-9.

## Quadros e figuras

**Quadro . Anticorpos empregados na avaliação morfológica de corações de suínos com e sem CMD**

<b>Anticorpo</b>	<b>Marca</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Referências</b>
<i>Anti-proANP</i>	Abcam	ab105450	1:50	-	Biondo et al., 2003
<i>Anti-desmina</i>	Dako	D33	1:300	Tris EDTA, pH 9,0	Radu et al., 2012
<i>Anti-vimentina</i>	Dako	V9	1:200	Tampão citrato, pH 6,0	Radu et al., 2012

ANP (peptídeo natriurético atrial)

**Quadro 2. Principais achados histopatológicos no miocárdio de suínos com cardiomiopatia dilatada e em suínos controles**

Suíno	Coração	Alterações histopatológicas							
		Atrofia de cardiomiócitos	Vacuolização sarcoplasmática	Ruptura de miofibras	Miofibras onduladas	Fibrose	Infiltração gordurosa	Infiltrado linfocitário intersticial	Trombose
1	VD	++	+	++	++	+	NO	+	NO
	VE	+	++	+	+	+	NO	NO	+
	SIV	+	+	+	+++	NO	NO	NO	NO
	MP	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
2	VD	++	+++	++	++	+	NO	NO	+
	VE	+	+	+	++	+	NO	NO	NO
	SIV	+	+	++	++	NO	NO	NO	NO
	MP	++	+++	NO	NO	NO	NO	NO	NO
3	VD	+	++	++	+	+	NO	NO	NO
	VE	++	+	+	++	+	NO	+	NO
	SIV	+	+	+	++	NO	NO	NO	NO



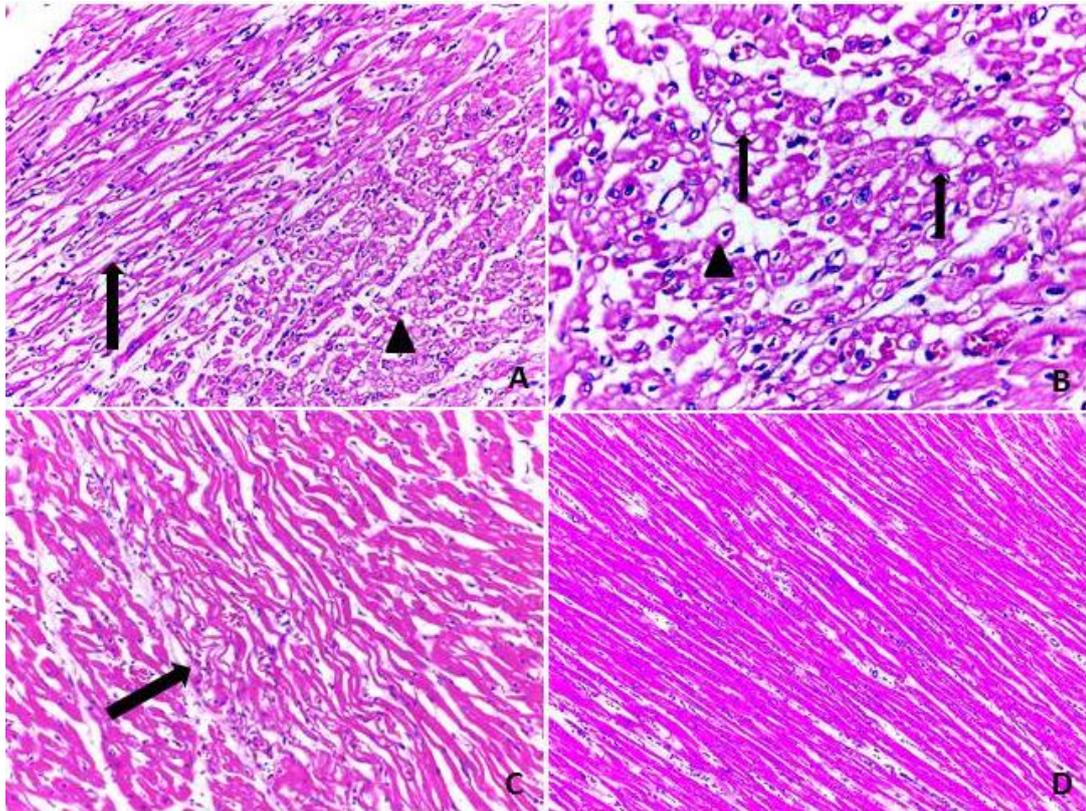
	VD	NO	NO	NO	++	NO	NO	NO	NO
8	VE	NO	NO	NO	+	NO	NO	NO	NO
	SIV	NO	NO	NO	NO	+	NO	NO	NO
	MP	NO	NO	NO	NO	+	NO	NO	NO

---

Legenda: NO (não observado), +++ (acentuado), ++ (moderado), + (discreto). Suínos 1 a 6 com CMD e suínos 7 e 8 sem CMD. Porções do miocárdio: parede de ventrículo direito (VD), ventrículo esquerdo (VE), septo interventricular (SIV) e musculo papilar (MP).

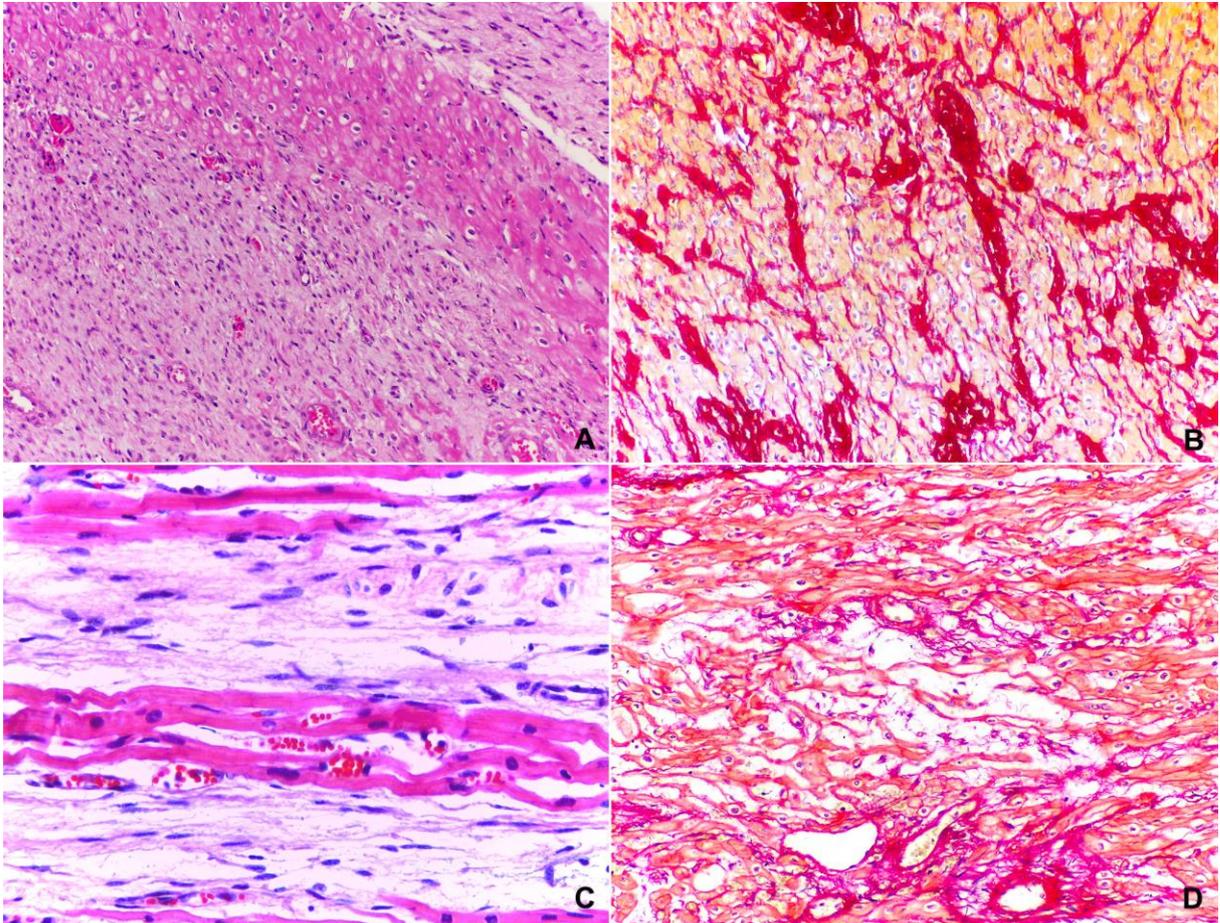
Figuras.

Figura1.

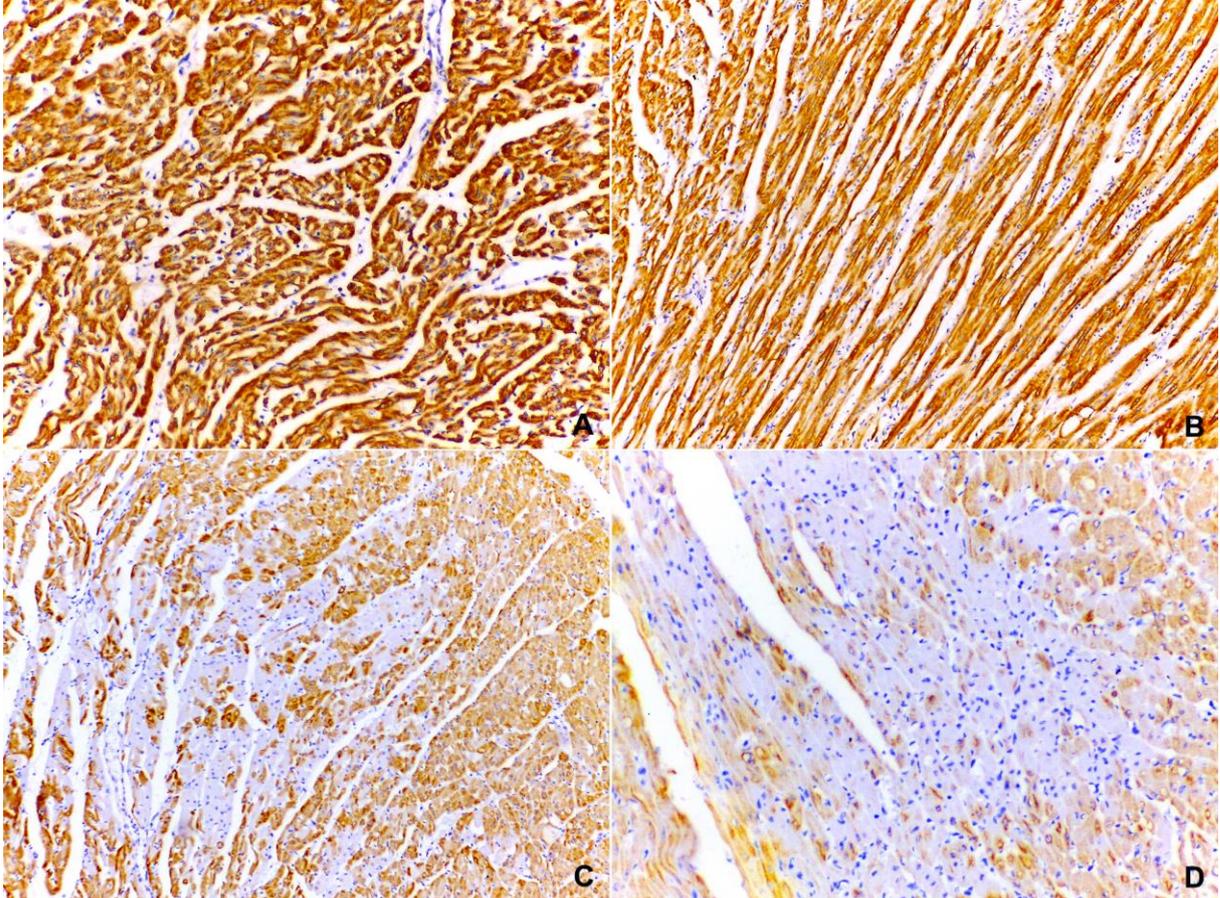


**Figures 1.** Caracterização histológica das principais lesões microscópicas observadas em corações de suínos com cardiomiopatia dilatada (CMD). **(A)** Ventrículo esquerdo, corte longitudinal e transversal, ruptura de fibras cardíacas, cardiomiócitos (seta) atrofiados com aspecto distorcidos e citoplasmas vacuolizados (cabeça da seta). H&E, obj. 10x. **(B)** Ventrículo esquerdo, corte transversal, cardiomiócitos atrofiados com aspecto distorcido com citoplasmas vacuolizados (seta), núcleo hiper cromático por vezes picnóticos e cromatina condensada (cabeça da seta). H&E, obj. 40x. **(C)** Septo interventricular, corte longitudinal, área central com atrofia (adelgaçamento) de fibras cardíacas, que adquiriram aspecto ondulado (seta). H&E, obj. 20x. **(D)** Septo interventricular, corte longitudinal, sem alterações histológicas. H&E, obj. 10x

**Figura 2.**

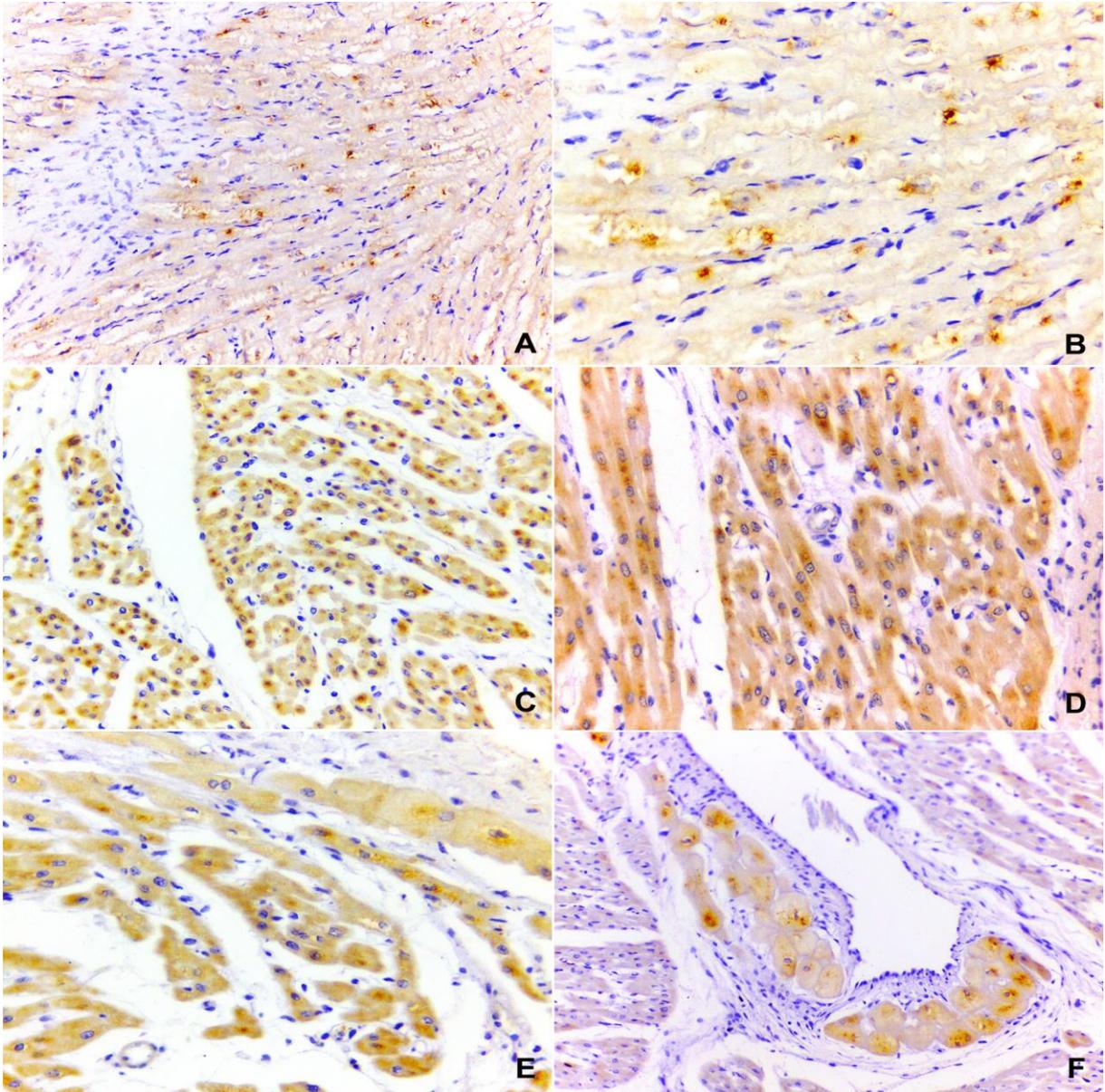


**Figures 2.** Caracterização histológica das principais lesões microscópicas observadas em corações de suínos com cardiomiopatia dilatada (CMD). **(A)** Músculo papilar, corte transversal, deposição moderada de tecido conjuntivo fibroso (seta) e cardiomiócitos com vacuolização perinuclear (cabeça da seta). H&E obj. 20x. **(B)** Músculo papilar, corte transversal, área de fibrose (Fig A) evidenciada de vermelho na coloração de Picrosírius. PS, obj. 20x. **(C)** Ventrículo esquerdo, corte longitudinal, deposição moderada de delgada camada de tecido conjuntivo entre fibras cardíacas que se encontram adelgadas. H&E, obj. 40x. **(D)** Ventrículo direito, corte longitudinal, deposição de delgadas camadas de tecido conjuntivo fibroso, entre fibras cardíacas vacuolizadas. PS, obj. 10x.

**Figure 3.**

**Figures 3.** Caracterização imuno-histoquímica das principais lesões microscópicas observadas em corações de suínos com cardiomiopatia dilatada (CMD). **(A)** Ventrículo direito, corte transversal, imunomarcção difusa acentuada anti-desmina em cardiomiócitos de coração de suíno controle. IHQ obj. 20x. **(B)** Ventrículo direito, corte longitudinal, imunomarcção difusa acentuada anti-desmina em cardiomiócitos de coração de suíno controle. IHQ obj. 20x **(C)**. Ventrículo esquerdo, corte transversal, área focalmente extensa com ausência de imunomarcção anti-desmina em cardiomiócitos. IHQ obj. 20x. **(D)** Ventrículo direito, corte longitudinal, área focalmente extensa com ausência de imunomarcção anti-desmina em cardiomiócitos. IHQ obj. 20x

Figura 4



**Figures 4.** Caracterização imuno-histoquímica em corações de suínos com cardiomiopatia dilatada (CMD). **(A)** Átrio, corte transversal, imunomarcção multifocal discreta anti-ANP em cardiomiócitos do coração de suíno com CMD. IHQ obj. 20x. **(B)** Átrio, corte transversal, imunomarcção multifocal discreta anti-ANP em cardiomiócitos do coração de suíno com CMD. IHQ obj. 40x. **(C)** Átrio, corte transversal, imunomarcção difusa moderada anti-ANP em citoplasma de cardiomiócitos do coração de suíno controle. IHQ obj. 20x. **(D)**. Átrio, corte longitudinal, imunomarcção difusa moderada anti-ANP com aspecto granular e predominantemente perinuclear no citoplasma de cardiomiócitos próximos ao endocárdio do coração de suíno controle. IHQ obj. 20x. **(E)**. Ventrículo direito, corte transversal, imunomarcção multifocal discreta anti-desmina em cardiomiócitos do coração de suíno com CMD. IHQ obj. 40x. **(F)**. Ventrículo esquerdo, corte transversal, imunomarcção difusa moderada anti-desmina com aspecto granular e predominantemente perinuclear em células de Purkinje no coração de suíno controle. IHQ obj. 40x.

## **5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Neste estudo a cardiomiopatia dilatada em suínos é de origem nutricional e sugere-se que esteja associada ao consumo de farelo de soja de baixa solubilidade.

A CMD deve ser relacionada como uma importante doença cardíaca que afeta principalmente suínos em fase de creche no Brasil.

Novos estudos devem ser realizados na tentativa de elucidar a real participação do farelo de soja de baixa solubilidade nos casos de CMD suínos.

As lesões macroscópicas e histológicas observadas nos suínos com CMD deste estudo são semelhantes às descritas em outras espécies.

A imuno-histoquímica anti-desmina é uma importante ferramenta que pode ser utilizada no diagnóstico de CMD em suínos.

## 6.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALBALESI, M.A.F. Cardiomiopatias. **Arq Bras Cardiol.** 71:95-107, 1998

BUCZINSKI S.; REZAKHANI A. & BOERBOOM D. Review heart disease in cattle: diagnosis, therapeutic approaches and prognosis. **Vet. J.** 184:258–263, 2010.

CLARK FD.; FRAME DD.; WARNICK RE.; KELLY EJ.; ROEDER BL. Effects of lowered dietary sodium chloride on spontaneous cardiomyopathy mortality in turkeys. In: **Proceedings of the 44th western poultry disease conference**, Western Poultry Disease, Sacramento, California, 5–7 March, pp. 22–23, 1995.

COLLINS D.E.; EATON K.A.; HOENERHOFF M.J. Spontaneous Dilated Cardiomyopathy and Right- Sided Heart Failure as a Differential Diagnosis for Hepatosis Dietetica in a Production Pig. **Comp Med** 65:327-332, 2015.

COULSON W. F & CARNES W. H. Cardiovascular studies on copper-deficient swine. IX. Repair of vascular defects in deficient swine treated with copper. **Am J Pathol.** 50: 861–868, 1967

CZARNECKI CM. Cardiomyopathy in turkeys. **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol** 1984; 77:591-8, 1984.

DAVIES M.J. The cardiomyopathies: an overview. **Heart.** 83:469–474, 2000.

EDWARDS W.D. Cardiomyopathies. **Hum. Path.** 18: 625-635,1987.

ELLIOTT P et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. **Eur. Heart J.** 29:270–276, 2008.

ENSLEY, S.V& OSWEILER, G.D. Toxic minerals, chemicals, plants and gases. In: Zimmerman, L, Karriker, A.R, Schwartz, K.J et al. **Diseases of Swine**,10<sup>th</sup> edition, Iowa :Wiley-Blackwell,10 ed, p-953-967, 2012.

FERASIN, L.et al. Feline idiopathic cardiomyopathy: a retrospective study of 106 cats (1994-2001). **J Feline Med Surg.** 5:151-159, 2003.

FRAME D.D.; HOOGE D.M.; CUTLER R. Interactive effects of dietary sodium and chloride on the incidence of spontaneous cardiomyopathy (round heart) in turkeys. **Poult Sci** 80:1572–1577, 2001.

- HARRISON, L.R et al. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **J Vet Diagn Invest.** 2:217-221, 1990.
- HARVEY, P.A.; LEINWAND, L.A. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. **J. Cell.Biol.** v. 194, n. 3, p355–365, 2011.
- HASCHEK, W.M.et al. Fumonisin toxicosis in swine: An Overview of Porcine Pulmonary Edema and Current Perspectives. **Environ. Heal. Perspect.**109:2, 2001.
- HORIUCHI N et.al. Detection of the nonsense mutation of OPA3 gene in Holstein Friesian cattle with dilated cardiomyopathy in Japan. **J. Vet. Med. Sci.** 77: 1281–1283, 2015.
- KEENE, B.W. et al. Myocardial L-carnitine deficiency in a family of dogs with dilated cardiomyopathy. **J Am Vet Med Assoc.** v.198, n. 4, p647-650, 1994.
- KONSTANZE, H.P.; BILL, J.; GALEY, F.D. Acute salinomycin toxicosis of pigs. **J. Vet. Diag. Invest.** v. 7, p419-420, 1995.
- KREHL, L. Beitrag zur kenntniss der idiopathischen hertzmuskelerkrankungen. (Dtsch.). **Arch Klin Med.**; v.48, p414-31, 1891.
- LOBO, L. L.; PEREIRA, R. Cardiomiopatia dilatada canina. **Rev. Portu de Ciên. Vet.** 97: 153-159, 2002.
- LIN QC, XU J, KAMARA D, GENG T, GYENAI K, REED KM, SMITH EJ. DNA sequence and haplotype variation in two candidate genes for dilated cardiomyopathy in the turkey *Meleagris gallopavo*. **Genome** 50:463–469, 2007.
- MAXIE, G.M.; ROBINSON, W.R. Cardiovascular system. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. **Pathology of Domestic Animals.** Vol.1-3. 5th ed. Saunders Elsevier, Toronto.p-31-50, 2007.
- MELLO, G. et al. Farelo de algodão em rações para suínos nas fases de crescimento e terminação. **Arch. Zootec.** 61:55-62, 2012.
- MILLER, M.; VAN VLEET, J.F.; GAL, A. Cardiovascular system and lymphatic vessels. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. **Pathologic basis of veterinary disease.** 5th ed, Mosby Elsevier, St Louis, Missouri, p-544-580, 2012.
- MISKIMINS, W.; NEIGER, R.D. Monensin toxicosis in swine. **J Vet Diagn Invest.** 8: 396-397, 1996.

NART P.; THOMPSON H.; BARRETT D.C.; ARMSTRONG S.C. & MCPHADEN A.R. Clinical and pathological features of dilated cardiomyopathy in Holstein–Friesian cattle. *Vet. Rec.* 155:355–361, 2004.

NOGUEIRA, V.A.; FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, P.V. Intoxicação por antibióticos ionóforos em animais. **Pesq. Vet. Bras.** 29:191-197, 2009.

O’GRADY M.R. & O’SULLIVAN M.L. Dilated cardiomyopathy: an update. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.* 34:1187–1207, 2004.

OCARINO, N.M. et al. Sistema Cardiovascular. In: Santos, L.S.; Alessi, A.C. **Patologia Veterinária**. Roca, São Paulo, p-51-8, 2010.

PALLARÉS F.J; YAEGER M.J; JANKE B.H; FERNÁNDEZ G; HALBUR PG. Vitamin E and selenium concentrations in livers of pigs diagnosed with mulberry heart disease. **J. Vet. Diagn. Invest.** 14:412-4, 2002.

RADU, R.I. et al. Histological and immunohistochemical changes of the myocardium in dilated cardiomyopathy. **J Morphol Embryol.** 53:269–275, 2012.

RAMIREZ, A. Herd Evaluation. In: Zimmerman, J.J, Karriker, L.A, Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. **Diseases of swine**, 10<sup>th</sup> edition, Iowa: Wiley-Blackwell, p-5-23, 2012.

REED K.M et al. Genomic analysis of genetic markers associated with inherited cardiomyopathy (round heart disease) in the turkey (*Meleagris gallopavo*). **Anim. Genet.** 38:211–217, 2007.

REESE, D.E.; MILLER, P.S. Nutrient Deficiencies and Excess. In: Zimmerman, J.J, Karriker, L.A, Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. **Diseases of swine**, 10<sup>th</sup> edition, Iowa: Wiley-Blackwell, p-923-937, 2012.

ROBINSON W.F & ROBINSON N.A. 2016. Cardiovascular System. p-44-50 In: Maxie M.G. (Ed.) Jubb, Kennedy and Palmer’s **Pathology of Domestic Animals**. 6<sup>th</sup> ed, Saunders Elsevier, St. Louis.

RICHARDSON P et al. Report of the 1995 World Health Organization/ International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. **Circulation.** 93: 841-842, 1996.

RICHARDS A.M. Natriuretic peptides. Update on peptide release, bioactivity, and clinical use. **Hypertension** 50:25-30, 2007.

ROBERSON KD. Induction of Round Heart Disease in Turkey Poults by Feed Texture. **Intern. J. Poult. Scienc.** 4: 177-181, 2005.

SHEN H Et al. Vitamin E and selenium levels are within normal range in pigs diagnosed with mulberry heart disease and evidence for viral involvement in the syndrome is lacking. **Transbound. Emerg. Dis.** 58:483-91, 2011.

SISSON, D.D.; THOMAS, W.P. Afecções do miocárdio. In: ETTINGER, S.J. ed. **Tratado de Medicina Interna Veterinária** 4 ed. São Paulo: WB Saunders, p. 1406-1410, 1995.

SMITH, H. A. The Pathology of Gossypol Poisoning. *Am J Pathol.* 33:353–365, 1957.

SOBESTIANSKY, J. et al. Intoxicação por minerais, produtos químicos, plantas e gases. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (ed.). **Doenças dos Suínos**, Goiânia: Cânone Editorial, p.553-580, 2012.

STENZEL T., TYKALOWSKI B. & KONCICKI A. 2008. Cardiovascular system diseases in turkeys. **Pol. J. Vet. Sci.** 11:245–50, 2008.

TIDHOLM, A.; JÖNSSON, L: A retrospective study of canine dilated cardiomyopathy (189 cases). **J Am Anim Hosp Assoc.** v. 33, p544–550, 1997.

TIDHOLM, A.; JÖNSSON, L.A. Histologic Characterization of Canine Dilated Cardiomyopathy. **Vet Pathol.** v. 42, p1–8, 2005.

VAN VLEET. J.F; FERRANS, V.J. Myocardial Diseases of Animals. **Am J Pathol.** v.124, n.1, p-98-157, 1986.