



**Universidade Federal de Campina Grande**  
**Centro de Saúde e Tecnologia Rural**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**  
**Campus de Patos – PB**

**DOENÇA DE CHAGAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS EM  
REGIÃO DO SEMIÁRIDO NORDESTINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**VANESSA LIRA DE SANTANA**

**PATOS – PB**  
**MARÇO - 2011**

**Universidade Federal de Campina Grande**  
**Centro de Saúde e Tecnologia Rural**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**  
**Campus de Patos – PB**

**DOENÇA DE CHAGAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS EM  
REGIÃO DO SEMIÁRIDO NORDESTINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**VANESSA LIRA DE SANTANA**  
**Orientador: Prof. Dr. Almir Pereira de Souza**

**PATOS – PB**  
**MARÇO - 2011**

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CSTR /

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

S232d

2011 Santana, Vanessa Lira de

Doença de Chagas em cães em região do semiárido nordestino  
/Vanessa Lira de Santana. - Patos - PB: UFCG/PPGMV, 2011.

39p.

Inclui Bibliografia.

Orientador: Almir Pereira de Souza.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Centro de  
Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1- Cardiologia veterinária. 2 – Cardiopatias em cães 3 – Doenças  
de Chagas – cães. 4 - Imunoparasitologia veterinária 5 – Saúde  
Pública. Título.

CDU: 612.17: 619

**VANESSA LIRA DE SANTANA**

**DOENÇA DE CHAGAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS EM  
REGIÃO DO SEMIÁRIDO NORDESTINO**

Dissertação aprovada pela Comissão Examinadora em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2011.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Almir Pereira de Souza  
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFMG

---

Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho  
Depto. de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV/ UNESP

---

Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade  
Depto. de Genética / CCB / UFPE

## **DEDICATÓRIA**

“Não veja o mundo com os olhos da inteligência

Veja com os olhos do coração,

Nele encontrará Deus”.

(Buda)

Aos meus amados pais, *Filemon Fernandes e Maria de Lourdes*, pelo amor a mim concedido em todos os momentos de minha vida e por exemplo me ensinar que na vida não é o que a gente faz que importa, mas quanto amor a gente dedica ao que faz.

Às minhas lindas irmãs, *Valesca Lira e Vanusca Maria* pelo apoio, carinho e por sempre estarem disponíveis a me ajudar.

Aos meus bichinhos, *ATP, Gorda e Mel* pela alegria que me dão.

A vocês, minha família, o meu amor eterno:

*“Agradeço pela [amizade](#) que, gentilmente,  
vocês me permitem desfrutar.*

*Agradeço pela energia que, positivamente,  
muitas batalhas vocês me ajudaram a ganhar.*

*Agradeço pela força que, bravamente,  
vocês conseguiram me emprestar.*

*Agradeço ao coração de vocês por todo carinho  
que podem me dar.”.*

*(autor desconhecido)*

Ao meu querido e sempre professor, *Almir Pereira de Souza* a quem ofereço minha imensa gratidão por tudo que fizestes por mim. Agradeço pelos conhecimentos cedidos, os quais me ajudaram a crescer e a tornar-me parte de quem sou. Obrigada pela amizade, pela confiança, pelo exemplo de conduta e de força.

## AGRADECIMENTOS

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Almeida de Melo** por aceitar a proposta deste trabalho, agradeço pela co-orientação, por me acolher em seu laboratório e pelo apoio. Muito Obrigada.

Ao **Prof. Dr. Pedro Isidro**, pela amizade, pelas orientações e por sempre está disponível a ajudar-me.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Galvão** pelas facilidades oferecidas em seu Laboratório e pela grande generosidade em me ajudar.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Antonia Cláudia Jácome** pela disponibilidade em me ajudar, pelo acolhimento e a simpatia. Devo a você parte do meu aprendizado sobre o *T. cruzi* e a doença de Chagas. Gostaria de expressar minha gratidão.

Ao **Prof. Paulo Guedes** pelo auxílio importante para conclusão desta pesquisa.

Aos membros da banca, **Professor Dr. Aparecido Antonio Camacho e Dr. Paulo Paes de Andrade** por terem aceitado expor suas opiniões sobre este trabalho e fazerem parte deste dia tão especial.

À **Secretaria de Saúde** representada por Ernani Mendes (Educador em Saúde), Gercino (Supervisor Geral da FUNASA) e Horácio (Supervisor Técnico da FUNASA) por colaborarem essencialmente e tão prontamente com esta pesquisa. Muito obrigada.

Ao **LACEM – PB** na pessoa da **Dr<sup>a</sup>. Antônia Lúcia** pela importante colaboração para realização deste estudo.

A **todos os agentes de Saúde** de Patos representado por Joel (Supervisor), Paulo, Patrícia, “Peixinho” e em Teixeira representado por Marcos pelo apoio e por me permitir vivenciar o importante papel que exercem em nossa sociedade.

Ao **Centro de Zoonose de Caicó**, Gracinha, Gustavo, Seu Antônio Bezerra e Seu “Anta” pela colaboração no trabalho a campo realizado em Caicó.

Ao **Prof. Dr. Adriano Fernandes**, pelos conhecimentos cedidos e por ter permitido a realização das análises clínicas no Laboratório de Patologia Clínica do CSTR/UFMG.



A **todos do Laboratório de Patologia Clínica**, Lu, Solange, Erotides, Cléber, Elaine e Laiane pelo auxílio na realização dos exames e conviver um pouquinho nesse ambiente alegre e harmônico só de vocês e construído por vocês.

Às minhas amigas **Luedja, Soraia e Tati** por saber que sempre posso contar com vocês. É recíproco.

Às minhas amigas e companheiras **Ana Lucélia, Dayanne, Raiara, Raizza e Fabíola** por compartilharem comigo a convivência, as diferenças, as lutas e as palhaçadas. Certa vez uma amiga me disse: *“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós, deixam um pouco de si e levam um pouco de nós”* (Antoine de Saint Exupéry )

Às biólogas **Daniele, Andressa e Denise** pelo apoio e amizade no Laboratório de Biologia de Parasito e de Doença de Chagas/UFRN.

A **todos os graduandos e pós-graduandos do Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido**, Gilzane, Aline Antas, Exedito, Tereza, Daniele, Edvaldo, Artur Pombo pelo que aprendi, pelo que pude ensinar e pelas horas de descontração. Vocês foram uma bússola neste mundinho tão pequeno.

Aos **professores e pós – graduandos** do Programa de Pós-graduação de Medicina Veterinária, pelos ensinamentos, momentos compartilhados, pelas dúvidas, dificuldades e alegrias.

Ao **residente Cesinha** pelo auxílio na pesquisa, pela paciência e por uma boa dose de baianice.

A **Prefeitura do Campus de Patos** representado por Geroan, Benício e Osvaldo por tentar sempre arranjar um jeito para que as viagens deem certo.

Aos **proprietários dos cães** que confiaram em mim e me permitiram estudá-los.

Ao **Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**, da Universidade Federal de Campina Grande, pela oportunidade concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**, pela concessão de bolsa.

A todos que me ajudaram neste projeto, sou imensamente grata.

## SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	3
3. CAPÍTULO I: Identificação de cães naturalmente infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> no semiárido nordestino .....	4
1. Abstract .....	5
2. Introdução.....	6
3. Material e Métodos .....	7
4. Resultados .....	10
5. Discussão .....	11
6. Conclusões .....	13
7. Referências .....	14
4. CAPÍTULO II: Caracterização clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> no semiárido nordestino	23
1. Abstract .....	24
2. Resumo .....	25
3. Introdução .....	25
4. Material e Métodos .....	26
5. Resultados e Discussão .....	27
6. Conclusão .....	30
7. Referências .....	30
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	38
6. ANEXO.....	39

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

<b>mov./min -</b>	Movimentos por minuto
<b>bat/mim -</b>	Batimentos por minutos
<b>FC -</b>	Frequência cardíaca
<b><i>f</i> -</b>	Frequência respiratória
<b>mg/dL -</b>	Miligrama por decilitro
<b>mmHg -</b>	Milímetros de mercúrio
<b>PAM -</b>	Pressão arterial média
<b>P(ms) -</b>	Duração da onda P
<b>P(mV) -</b>	Amplitude da onda P
<b>PR(ms) -</b>	Duração do segmento PR
<b>QRS(ms) -</b>	Duração do complexo QRS
<b>QT(ms) -</b>	Duração do segmento QT
<b>R(mV) -</b>	Amplitude da onda R
<b>RR(ms) -</b>	Duração do intervalo RR
<b>T -</b>	Temperatura retal

## LISTA DE TABELA

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1-</b> Resultado da sorologia para doença de Chagas, em valor absoluto (N) e percentagem, de cães provenientes dos municípios de Caicó/RN e Patos e Teixeira/PB, em 2010 .....	<b>18</b>
<b>Tabela 2-</b> Valores absolutos e percentagem de animais positivos e negativos para <i>Trypanosoma cruzi</i> pelas técnicas de RIFI e ELISA provenientes dos municípios de Caicó/RN, Patos e Teixeira/PB, em 2010 .....	<b>19</b>
<b>Tabela 3-</b> Positividade da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da hemocultura (HC) de cães reativos e não reativos sorologicamente para <i>Trypanosoma cruzi</i> procedentes do semiárido nordestino .....	<b>20</b>
<b>Tabela 4-</b> Distribuição da reatividade sorológica anti- <i>Leishmania</i> spp. em número e percentagem relacionada a reatividade sorológica para <i>Trypanosoma cruzi</i> (RIFI e ELISA) .....	<b>21</b>

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1-</b> Resultados clínicos de cães infectados naturalmente pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> no semiárido nordestino realizados no Hospital Veterinário – UFCG, Campus de Patos, 2010 .....	<b>33</b>
<b>Tabela 2-</b> Resultados eletrocardiográficos de cães infectados naturalmente pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> no semiárido nordestino realizados no Hospital Veterinário – UFCG, Campus de Patos, 2010 .....	<b>34</b>

<b>Tabela 3-</b> Resultados do eritrograma de cães infectados naturalmente pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> no semiárido nordestino realizados no Hospital Veterinário – UFCG, Campus de Patos, 2010 .....	<b>35</b>
<b>Tabela 4-</b> Resultados do leucograma realizado de cães infectados naturalmente pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> no semiárido nordestino realizados no Hospital Veterinário – UFCG, Campus de Patos, 2010 .....	<b>36</b>
<b>Tabela 5-</b> Resultados das análises bioquímicas de cães infectados naturalmente pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> no semiárido nordestino realizados no Hospital Veterinário – UFCG, Campus de Patos, 2010 .....	<b>37</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1-** Gel de poliacrilamida mostrando a amplificação específica de 330 pb (→) de minicírculos do kDNA do *T.cruzi* em sangue de cães cronicamente infectados. (PM) peso molecular; (CN) controle negativo; (CP) controle positivo; (1-8) amostras de sangue de cães; (PM) marcadores de peso molecular de 100pb 22

## 1. INTRODUÇÃO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o parasita flagelado agente da doença de Chagas e de significativa importância médica na América Latina. O ciclo de vida do parasita alterna entre mamíferos vertebrados e insetos, com principais diferenças nos estágios de desenvolvimento envolvendo cada hospedeiro, como a replicação de epimastigotas no estômago, sua diferenciação às formas tripomastigotas metacíclicas infectivas, principalmente no intestino e reto do vetor, e replicação intracelular de amastigotas, diferenciando-se em seguida em tripomastigotas na corrente sanguínea após ruptura da membrana celular nos mamíferos (Brenner et al., 2000; Buscaglia e Noia, 2003).

Esse ciclo biológico alternativo do *T.cruzi* caracteriza os diferentes ciclos epidemiológicos da doença em doméstico, peridoméstico e silvestre. No ciclo silvestre ocorre a interação entre o vetor e vertebrados mamíferos em ecótopos naturais do continente americano. No ciclo doméstico há a transmissão vetorial aos seres humanos e no ciclo peridoméstico ocorre a intervenção dos mamíferos como cães e gatos que, livremente, entram e saem das residências, servindo de ligação entre os ciclos doméstico e silvestre (Schmuñis, 2000).

Vários experimentos têm sido realizados em cães por servirem como modelo para estudos das manifestações clínicas durante o curso da doença que ocorrem em humanos (Lana et al., 1992). O modelo serve, por exemplo, para o estudo do desenvolvimento da doença por diferentes linhagens do parasita, determinando inclusive, métodos diagnósticos mais adequados para sua detecção ou isolamento em cada fase da doença (Veloso et al., 2008).

Em alguns países, os cães são considerados os principais reservatórios domésticos para a infecção humana, com um papel na epidemiologia da doença de Chagas ainda não confirmada. Dessa forma, investigações acerca de infecções em cães por *T.cruzi* necessitariam ser incluídas na saúde pública, visto ser essa doença comum em áreas rurais, com aumento dos relatos em áreas urbanas e grande variabilidade epidemiológica (Barr et al., 1991, Gürtler et al., 2007, Rosypal et al., 2007).

Desta forma, apesar de terem sido realizados vários estudos experimentais que caracterizassem a clínica dessa doença em suas fases e formas, há poucos estudos no Brasil que confirmem o papel do cão como reservatório e sua manifestação clínica após infecção natural. Assim, objetivo geral desta pesquisa foi identificar e caracterizar clínica e laboratorialmente cães infectados de forma natural com *Trypanosoma cruzi*.



## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barr, S.C.; Dennis, V.A.; Klein, T.R. Serologic and blood culture survey of *Trypanosoma cruzi* infection in four canine populations of southern Louisiana. *Am. J. Vet. Res.*, v.52, n.4, p.570 -573, 1991.
- Brener, Z., Andrade, Z. A., Barral-Neto, M., 2000. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 430p.
- Buscaglia, C.A., Noia, J.M. Di. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infection*, v.5, p. 419-427, 2003.
- Gürtler, R.E.; Cecere, M.C.; Lauricella, M.A. et al. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*. v.134, n.1, p.69–82, 2007.
- Lana, M.; Chiari, E.; Tafuri, W.L. Doença de Chagas experimental em cães. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.87, n.1, p.59-71, 1992.
- Rosypal, A.C.; Cortés-Vecino, J.A.; Gennari, S.M. et al. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. *Veterinary Parasitology*, 149, p.172-177, 2007.
- Schmuñis, G.A. A tripanosomíase americana e seu impacto na saúde pública da América. In: Brener, Z., Andrade, Z. A., Barral-Neto, M.. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 430p., 2000.
- Veloso, V.M., Guedes, P.M.M., Andrade, I.M., Caldas, I.S., Martins, H.R., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L.L., Lana, M., Galvão, L.M.C., Bahia, M.T., Chiari, E. *Trypanosoma cruzi*: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of Beagle dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v.103, n.6, p. 528-534, 2008.

**3. CAPÍTULO I: IDENTIFICAÇÃO DE CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS COM *Trypanosoma cruzi* NO SEMIÁRIDO NORDESTINO**

Manuscrito a ser submetido à Revista  
Veterinary Parasitology./American Association  
of Veterinary Parasitologists (AAVP) - ISSN  
0304-4017

# Identificação de cães naturalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino<sup>1</sup>

V. L. Santana<sup>a</sup>, A.P. Souza<sup>a</sup>, D.A.S.D.Lima<sup>a</sup>, A.L.Araújo<sup>a</sup>, T.E.F.Rotondano<sup>b</sup>, E.K.A.Camboim<sup>a</sup>,  
L.M.C. Galvão<sup>c</sup>, A.C. J. Câmara<sup>d</sup>, M.A.Melo.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, PB. Av. Universitária, s/n. Bairro Sta. Cecília, Patos - PB, CEP: 58.708-110. \*Autor para correspondência: [almir@cstr.ufcg.edu.br](mailto:almir@cstr.ufcg.edu.br).

<sup>b</sup>Programa Pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), Universidade Federal de Pernambuco, PE. Av. Professor Moraes Rego, n. 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901. E-mail: [terezarotondano@hotmail.com](mailto:terezarotondano@hotmail.com)

<sup>c</sup> Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN. Rua. General Gustavo Cordeiro de Farias, Petrópolis, CEP: 59012-570. e-mail: [galvão@mono.icb.ufmg.br](mailto:galvão@mono.icb.ufmg.br)

<sup>d</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN. Rua. General Gustavo Cordeiro de Farias, Petrópolis, CEP: 59010-180. E-mail: [antcla@cb.ufrn.br](mailto:antcla@cb.ufrn.br)

**ABSTRACT.-** Chagas's disease is a chronic clinical course of anthroponosis caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) being the dog an important domestic reservoir of the parasite. The aim of this study was to identify and confirm the presence of *Trypanosoma cruzi* in naturally infected dogs in the semiarid northeast. We collected blood samples from 170 domestic dogs in rural municipalities of Patos and Teixeira, in the state of Paraíba, and Caicó in the state of Rio Grande do Norte. The diagnosis of *T. cruzi* was performed by direct microscopy of smears, blood culture, indirect fluorescent antibody reaction test (IFAT), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR). To identify cross-reactive and / or co-infection with *Leishmania chagasi*, the sera were tested by RIFI (Biomanguinhos) and ELISA S7 recombinant. Research on blood smear was negative. Serology was positive in 8.8% (15/170) of samples with the highest percentage in the city of Caico, 11.8%, followed by Patos with 9.1% and Teixeira with 5.7%. The result was indeterminate in 66.5% of samples. In ELISA, 73.5% of samples were positive and RIFI, 10.6%. Among 10 dogs that were seropositive, 90% were positive by PCR and 20% in blood cultures. In the uncertain samples (RIFI + / ELISA-) there was an amplification in 66.6%, with no growth in blood cultures. Among the dogs with positive serology, 10.9% also were positive by RIFI for *Leishmania* spp. and 26.5% in the recombinant ELISA S7. Among the reagents and undetermined samples, 3.1% were positive by RIFI and ELISA S7. Among the negative results for *T. cruzi*, there were 14 animals positive for visceral leishmaniasis, 5 (five) in RIFI, 8 (eight) in ELISA S7 and 1 (one) in both techniques. Considering the ELISA S7 as the gold test, 24.7% (42/170) of animals were positive for *L. chagasi* and among the reactants for *T. cruzi*, 60% were infected. Although Chagas disease is a zoonosis, there is no imminent risk of formation of a domestic cycle, because dogs are in the chronic phase, and because of the vectors found, they do not present a home habit. Further studies are needed for epistemological

---

\* Corresponding author. Tel.: (83) .....

Fax:.....

E-mail address: [almir@cstr.ufcg.edu.br](mailto:almir@cstr.ufcg.edu.br) (A.P.Souza)

characterization that can prove the risk factors, the route of infection and the identification of the strain in dogs to evaluate the real importance of this species as a reservoir in the domestic cycle.

Keywords: Disease's Chagas, laboratorial diagnostic, canids, Brazil.

## 1. Introdução

A Doença de Chagas é uma antropozoonose de curso clínico crônico, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*). Sua transmissão ocorre, principalmente, por insetos hematófagos da família Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), conhecidos por triatomíneos, e por mecanismos secundários como a transmissão por via oral (Dias et al., 2002).

Este parasita tem sido detectado em uma ampla variedade de mamíferos domésticos e selvagens incluindo cães, gatos, roedores e marsupiais (Brener et al., 2000). Em alguns países, o cão é considerado um importante reservatório doméstico do parasita (Barr et al., 1991; Montenegro et al., 2002; Gürtler et al., 2007). Este animal desenvolve alterações patológicas crônicas que assemelham-se às detectadas em humanos (Andrade & Andrade, 1980; Williams et al., 1977; Meurs et al., 1998).

Normalmente a infecção natural de cães por *T. cruzi* acontece da mesma forma que em humanos, isto é, através da transmissão ativa pelo vetor, por contaminação de fezes infectadas na pele e/ou conjuntiva. Sugere-se também, que a infecção ocorra através do contato com os triatomíneos pelo ato instintivo de mastigar ou segurá-los com a boca ou ainda comendo tecidos infectados de roedores ou outros animais silvestres, presentes no peridomicílio e/ou domicílio (Barr et al., 1991; Montenegro et al., 2002; Lucheis et al., 2005).

Em cães, como em seres humanos, a doença apresenta quatro formas clínicas: aguda, crônica indeterminada, subaguda e crônica determinada; podendo esta manifestar lesões cardíacas, digestivas e, menos comumente, a nervosa (Brener et al., 2000; Camacho et al., 2003).

De acordo com o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2005), os critérios laboratoriais de definição diagnóstica desta patologia são o parasitológico, seguido pelo sorológico caso o primeiro resulte negativo. Entre os métodos indiretos está a

hemocultura que apesar de altamente específica, possui baixa sensibilidade (50-74%) (Junqueira et al., 1996). As técnicas sorológicas utilizadas são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), com sensibilidade entre 68% e 100% e especificidade de 74% a 100% (Alves e Bevilacqua, 2004; Ikeda-Garcia e Marcondes, 2007) e o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), apresentando sensibilidade entre 90% e 100%, e especificidade de 80% (Luciano et al., 2009).

A Reação em cadeia polimerase (PCR) é considerada uma técnica alternativa para o diagnóstico parasitológico, podendo ser associada aos métodos sorológicos para confirmação da infecção do *T. cruzi*, na fase crônica da doença (Gomes et al., 1998; Castro et al., 2002). Para tanto, tem-se empregado a amplificação de sequência de DNA nuclear e/ou sequência do minicírculo do DNA do cinetoplasto do *T. cruzi* em sangue ou soro (Ávila et al., 1991; Britto et al., 1993; Junqueira et al., 1996).

Desta forma, objetivou-se, com este estudo, identificar a presença de *T. cruzi* em cães infectados de áreas rurais na região do semiárido nordestino.

## **2. Material e métodos**

A área estudada foi determinada após consulta do banco de dados da Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba e do Estado do Rio Grande do Norte priorizando os municípios com maior incidência de casos humanos, registrados no Sistema Nacional de Notificação de pessoas com doença de Chagas (SINAN), e de barbeiros infectados com *T. cruzi*, capturados nas residências (áreas domiciliar e peridomiciliar) como parte do Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh). Estes dados foram correspondentes ao período de 2005 a 2009 e as espécies de triatomíneos mais prevalentes foram *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus lutzi*.

Foram coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular ou cefálica de 170 cães domiciliados nas áreas rurais dos municípios de Patos (n= 66) e Teixeira (n=53) no estado da Paraíba e Caicó (n=51) no estado do Rio Grande do Norte. O sangue foi distribuído em tubos de ensaio com e sem etilenodiaminotetracético (EDTA 10%) que então seguiram acondicionados em recipientes térmicos para posterior análise laboratorial.

O esfregaço sanguíneo de sangue periférico foi corado por método panótico (Panótico rápido - Laborclin produtos para laboratórios Ltda.) e avaliado por microscopia direta no Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) – Campus de Patos – PB.

A RIFI e o ELISA para *T. cruzi* foram realizados no Laboratório de Biologia de Parasitos e de Doença de Chagas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

As amostras foram processadas e analisadas pelo teste da RIFI para *T. cruzi* (reagente  $\geq$  1:20) seguindo o método adaptado de Camargo (1984). Foram utilizadas lâminas impregnadas com os antígenos cultivados de *T. cruzi*, cepa Y e os soros foram diluídos 1:20 a 1:1280 em solução de PBS pH 7.2, e distribuídos cerca de 20 $\mu$ l, em poços demarcados na lâmina. Depois de incubar a 37°C por 30 minutos em câmara úmida, lavaram-se as lâminas cinco vezes com solução PBS pH 7.2 e em seguida com água destilada, colocando-as para secar. Adicionou-se uma gota da solução de anticorpos de cabra contra anticorpos de cão, conjugados a peroxidase (Bethyl Laboratories, USA), diluído em Azul de Evans a 1:5000 em cada área. Após uma nova incubação por 30 minutos a 37°C, lavaram-se e secaram-se as lâminas como anteriormente, e foram montadas com glicerina tamponada (pH 9,0) e lamínula. As lâminas preparadas foram observadas à microscopia de imunofluorescência, em objetivas de 40x sem a utilização do óleo de imersão, atribuindo-se resultado positivo a fluorescência de parasitas mais intensa nas paredes celulares, no cinetoplasto e flagelo. Considerava negativo os parasitas não corados pelo fluorocromo ou apresentando apenas coloração esverdeada, pouco intensa e sem brilho, difusa no citoplasma. Essa avaliação contou com a presença de três observadores.

O teste de ELISA (in house) foi realizado de acordo com a técnica de Voller et al. (1976) com as modificações introduzidas por Guedes et al., 2007. Para a obtenção do antígeno (Ag), os flagelados foram isolados de uma cultura da cepa Y de *T. cruzi* em meio LIT, na fase exponencial de crescimento e o conjugado utilizado foi uma solução de anticorpos de cabra contra anticorpos de cão, conjugados a peroxidase diluída de 1:40.000, obtida de soro imune de cabra e marcada com peroxidase (Bethyl Laboratories, USA). Os soros dos cães foram diluídos 1:160 e o ELISA foi considerado

positivo (cut-off = 0,284) quando a leitura em densidade ótica foi maior do que a média de 10 soros negativos mais duas vezes o desvio padrão. A leitura da reação colorimétrica foi realizada a 450nm em leitor de microplacas (EMAX, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

Seguindo a recomendação do Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2005), a sorologia convencional (ELISA e RIFI) é considerada reagente quando dois testes diferentes são reativos, indeterminada quando apenas um teste é reativo e não reagente quando dois testes não são reativos.

Os animais sororeagentes no teste de RIFI para *T.cruzi* foram transportados ao Hospital Veterinário e submetidos à nova coleta de sangue para realização da análise molecular e hemocultura assepticamente.

A PCR seguiu o protocolo proposto por Gomes et al. (1998) e Veloso et al. (2008) e foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular (Biomol) da UFRN.

As amostras de sangue humano de pacientes infectados com as cepas tipo I, II e III), além de DNA extraído de cultura (cepa Y) e de amostras de sangue humano negativas para infecção por *T. cruzi* foram empregadas nos controles da PCR. Os cães com sorologia não reagente do experimento e sangue de cão sabidamente positivo para *Trypanosoma cruzi* também foram usados como controles negativos e positivos, respectivamente. Foram coletados e lisados 5 mL de sangue com um volume igual de solução tampão GE (6M guanidina (Amaresco® - CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub>CHNS/ MW- 118,16), 0,2M EDTA, pH 8.0) (Ávila et al., 1991) e em seguida a mistura foi fervida a 100°C por 15 minutos para ocorrer a linearização dos minicírculos concatenados na rede de kDNA permitindo distribuição homogênea das sequências alvo presentes na amostra e, então, estocada a 4°C até o momento da extração (Britto et al., 1993). A extração foi realizada em duplicatas com 200 uL da mistura sangue – GE segundo Gomes et al. (1998) e Veloso et al. (2008).

A amplificação do fragmento de 330 pares de bases em PCR foi realizado em um volume total de 18 uL contendo 10,34uL de água destilada estéril, Tampão 10x (50 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0.1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 750 mM KCl)(Invitrogen), 2.5 mM (cada) dATP, dTTP, dGTP e dCTP (Sigma Co. Ltda.), 5U/uL de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 25 pmol de primers 121 F

(5'AAATAATGTACGGG(T/G)-GAGATGCATGA3') e 122 R  
(5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA3') (Wincker et al., 1994; Gomes et al., 1998) e 2 uL de DNA diluído com água Mili-Q para cada amostra e logo em seguida foi colocado uma gota de óleo mineral.

Os tubos para PCR foram mantidos no gelo evitando reações inespecíficas e desnaturação da enzima; e, em seguida sujeitado a amplificação em um termociclador automático (Mastercyclergradient-ependorf–Authorized Thermal Cyclor). O programa de desnaturação constitui de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos e 35 ciclos, com desnaturação do DNA a 95°C por 1 minuto, pareamento dos iniciadores a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final de 10 minutos. Os produtos amplificados de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados com nitrato de prata seguindo o protocolo descrito por Veloso et al., 2008. A PCR foi considerada positiva após três extrações de cada amostra e duas amplificação de cada extração (Gomes et al., 1998). As amostras eram aplicadas em duplicatas utilizando em cada gel todos os controles positivos e negativos.

A hemocultura foi realizada nos cães com sorologia reativa através do cultivo de 10ml de amostras de sangue de acordo com Chiari et al. (1989) adaptada por Veloso et al. (2008). Os tubos foram incubados a 28°C, mantidos em meio bifásico (NNN + LIT) sendo agitados levemente duas vezes por semana e examinados ao microscópio aos 30, 60, 90 e 120 dias pós cultivo, observando-se alíquotas de 10µl da suspensão de cada tubo entre lâmina e lamínula, com aumento de 400x.

Adicionalmente, foram realizados a RIFI (KIT IFI- Leishmaniose Visceral Canina Biomanguinhos – Licenciada pelo Ministério da Agricultura) e o ensaio imunoenzimático ELISA S7 recombinante (ELISA/S7®- BIOGENE Indústria e Comércio LTDA ME), no Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido (UAMV/UFCG). As técnicas seguiram as instruções do fabricante. Estes testes foram empregados como forma de determinar reações cruzadas e/ou co-infecção com *Leishmania chagasi*.

### 3. Resultados



A presença de cães com doença de Chagas foi estudada em 30 comunidades rurais. Das 170 amostras de soro coletadas, a pesquisa em esfregaço sanguíneo foi negativa, sendo a sorologia reagente em 8,8% (15/170); a maior percentagem foi registrada no município de Caicó com 11,8% (6/51), seguida pelo município de Patos com 9,1% (6/66) e Teixeira com 5,7% (3/53). O resultado das amostras foi considerado indeterminado em 66,5% (113/170), com percentagens semelhantes entre os municípios (Tabela 1).

Do total de exames realizados 73,5% (125/170) foram reativos no teste de ELISA e apenas 18/170 (10,6%) no RIFI; destes, três foram negativos no ELISA (Tabela 2).

Dos 15 cães considerados reagentes (RIFI+/ELISA+), 10 (66,6%) foram avaliados nos testes de PCR e hemocultura (Figura 1). Os demais foram a óbito antes de uma nova coleta de sangue. Foi observada amplificação do fragmento do DNA de *T. cruzi* de 330 pares bases em 90% dos cães sorologicamente reagentes com isolamento em duas amostras na hemocultura (Tabela 3). Em amostras do município de Teixeira/PB com resultado indeterminado (RIFI+/ELISA-) houve amplificação em 66,6% (2/3) dos animais.

Entre os cães com sorologia positiva para doença de Chagas, 10,9% (14/128) foram reativos na RIFI (IFI - Biomanguinhos) para leishmaniose visceral (Caicó/RN - 21,5%; Patos/PB - 4,5%; Teixeira/PB - 9,4%). No teste de ELISA S7 recombinante, a positividade foi de 26,5% (34/128). Em 3,1% das amostras foram positivas em ambos os testes, RIFI (IFI - Biomanguinhos) e ELISA S7. Entre os não reagentes para *T. cruzi*, 5 foram positivos na RIFI, 8 positivos no ELISA S7 e apenas 1 foi positivo nas duas técnicas. Considerando o ELISA S7 como teste ouro, 24,7 % (42/170) dos animais foram positivos para *L. chagasi* e entre os reagentes para *T. cruzi*, 60% apresentavam reação cruzada (Tabela 4).

#### 4. Discussão

A região Nordeste é considerada endêmica para Doença de Chagas humana, com elevada prevalência da infecção na zona rural de 4,2%, conforme relato de Silveira e Vinhaes (1998). Neste trabalho, a positividade sorológica nos cães de Patos e Teixeira foi próxima ao observado em humanos no sertão paraibano de 9,5% (Coura et al., 1996) e superior aos dados de Caicó-RN com 3,7% (Câmara, 2008). A maior infectividade dos cães talvez se deva ao fato de que, apesar dos programas de controle estarem mais ativos no combate ao vetor, estes animais de áreas rurais encontram-se mais expostos, principalmente por viverem no peridomicílio, junto a galinheiros e depósitos de alimentos. Em Patos, o 6º Núcleo Regional e a FUNASA são responsáveis pelo controle de endemias em 24 municípios circunvizinhos. Como parte do Programa de Controle da Doença em Chagas, rotineiramente, são realizadas visitas nas áreas endêmicas, os barbeiros são coletados para identificação das espécies e verificação da contaminação por tripanossoma. As casas com presença de triatomíneos hematófagos são borrifadas nos domicílios e peridomicílios. Os triatomíneos mais encontrados nessa região foram o *Triatoma pseudomaculata*, *T. brasilienses* e *Panstrongylus lutzi*. Desta forma, apesar dos programas ativos pelos órgãos públicos determinar redução de triatomíneos que participem do ciclo doméstico, a constatação de cães com doença de Chagas levanta uma alerta sobre a presença do ciclo peridoméstico mantida pelos cães. No entanto, ainda não se sabe qual o papel destes como promotores da infecção em humanos.

Souza et al. (2009) no Mato Grosso do Sul constatou 22,6% de cães sorologicamente reagentes e 24% indeterminado e a soropositividade de Caicó-RN foi semelhante ao observado por Amóra (2004) em Mossoró-RN, de 16% (10/52). Em áreas rurais da Costa Rica e nordeste da Argentina a prevalência foi de 27,7% (15/54) e 60,3% (41/68) respectivamente (Montenegro et al., 2002; Gürtler et al., 2007). A prevalência mais alta nestas regiões pode ser justificada pela existência de outras espécies de barbeiros, como *T. dimidiata* e *T. infestans*. Neste estudo, a percentagem de cães sororeagentes infectados por *T. cruzi* foi 8,8%, entretanto o número amostral precisa ser aumentado para se estimar a prevalência real.

Entre os resultados sorológicos indeterminados, 64,7% foram positivos apenas no ELISA que se deve ao fato do antígeno utilizado ser a base de extratos de epimastigotas

brutas, possibilitando reação cruzada com outros patógenos, como *Ehrlichia platys*, *Babesia gibsoni*, *Ancylostoma caninum*, e, principalmente com *Leishmania* spp. (Barr et al., 1991).

Entre os reagentes para Chagas, 24,7% também foram soropositivos para *Leishmania chagasi* no ELISA S7 recombinante indicando reação cruzada. O kit ELISA S7 apresenta como antígeno recombinante a região carboxi-terminal de Hsp70 de *Leishmania chagasi* que, quando testado com soros humanos não apresentou reação cruzada com *Trypanosoma cruzi* (Andrade et al., 1992). Estes resultados sugerem que o ELISA S7 não é tão específico para leishmaniose visceral canina, como foi verificado para humano.

Da mesma forma que o ELISA, a RIFI está sujeita à ocorrência de reações cruzadas com antígenos de *Leishmania* spp., especialmente pela proximidade filogenética entre os parasitas (Luciano et al., 2009), devido em parte aos antígenos de superfície e dos microtúbulos do citoesqueleto do protozoário serem conservados entre os tripanossomatídeos (Badaró et al., 1986). Como uma das medidas de controle do calazar humano é o sacrifício do cão, verifica-se a necessidade de técnicas mais específicas para evitar eutanásia de cães falsos positivos, principalmente onde a doença de Chagas é endêmica.

Em duas amostras sorologicamente indeterminadas (RIFI+/ELISA-) foi amplificado DNA do parasito na PCR (Tabela 3); fato também observado em humanos por Gomes et al. (1999). Devido às limitações dos testes sorológicos quanto à especificidade e sensibilidade, a PCR pode ser utilizada como método complementar para diagnóstico em resultados indeterminados. Para humanos, Gomes et al. (1999) sugerem a utilização da PCR também como um método complementar para monitoramento de cura após tratamento e na seleção de doadores de sangue.

Entre as amostras reagentes, apenas uma não foi positiva na PCR. Isto pode ter ocorrido pela ausência de parasitas nos 5mL de sangue coletado, diferente do padronizado para humanos, que varia de 15 a 20 mL (Britto et al., 1993 e Gomes et al., 1998). A clivagem física da rede de kDNA por calor fornece um limite de detecção de até um único parasito em 10 mL de sangue coletado (Britto et al., 1993), mais especificamente 1/100 (0,2 fg de DNA) do *T.cruzi* (Freitas et al., 2009).

Apenas 20% (2/10) das amostras foram positivas na hemocultura e essa baixa sensibilidade também foi observada em cães por Barr et al., (1991) e em humanos por Câmara (2008). O isolamento do *T. cruzi* é dificultado pelo baixo número de formas tripomastigotas no sangue de pacientes crônicos porque a parasitemia é escassa e intermitente (Chiari et al., 1989; Castro et al., 2002). Veloso et al. (2008) observaram experimentalmente que na fase crônica da doença de Chagas há redução da parasitemia dependente do tipo de cepa, interferindo na sensibilidade da hemocultura. Franco et al. (2002) afirmam que aumentando a quantidade de sangue, eleva-se a possibilidade de se encontrar o tripanosoma circulante. Devido a essa baixa parasitemia também não foram encontradas formas infectantes na microscopia direta em esfregaço de sangue.

## **5. Conclusões**

Diante dos resultados obtidos pode-se confirmar a infecção natural de cães com *T. cruzi* na região do semiárido nordestino. No entanto, devido similaridades filogenéticas com a *Leishmania* spp. é necessária a adoção de testes complementares específicos tanto para identificação da infecção pelo *T. cruzi* com enfermidades causadas por outros patógenos.

Conclui-se também que são necessários novos estudos para caracterização epidemiológica que comprovem os fatores de risco, a via de infecção e a identificação da linhagem circulante nos cães para avaliar a real importância desta espécie como reservatório no ciclo doméstico.

## **Agradecimentos**

A Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba, aos agentes de saúde da Casa da Dengue, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

## **6. Referências**

- Alves, W.A., Bevilacqua, P.D., 2004. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad. Saúde Públ.* 20(1), 259-265.
- Amóra, S.S.A., 2004. Epidemiologia da Leishmaniose e tripanossomíase canina no município de Mossoró, Rio Grande do Norte. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 90p.
- Andrade, C. R., Kirchhoff, L.V., Donelson, J.E., Otsu, K., 1992. Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *J. Clin. Microb.* 30(2), 330-335.
- Ávila, H., Sigman, D.S., Cohen, L.M., Millikan, R.C., Simpson, L., 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: Diagnosis of chronic Chagas disease. *Mol. Bioch. Parasitol.* 48, 211-222.
- Badaró, R., Reed, S. G., Barral, A., Orge, G., Jones, T. C., 1986. Evaluation of the micro enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35(1), 72-78.
- Barr, S.C., Dennis, V.A., Klein, T.R., 1991. Serologic and blood culture survey of *Trypanosoma cruzi* infection in four canine populations of southern Louisiana. *Am. J. Vet. Res.* 52(4), 570 -573.
- Brener, Z., Andrade, Z. A., Barral-Neto, M., 2000. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 430p.
- Britto, C., Cardoso, M. A., Wincker, P., Morel, C. M., 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 88,171-172.
- Câmara, A.C.J., 2008. Variabilidade genética de amostras do *Trypanosoma cruzi* isoladas no semiárido potiguar, RN. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 138p.
- Camacho, A. A., Mucha, C. J., Belerenian, G. C., 2003. Afecções Cardiovasculares em Pequenos Animais. Interbook, São Paulo, 328p.

- Camargo, M.E. et al., 1984. Inquérito sorológico da prevalência da infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. Rev. Inst. Med. Trop. 26, 192-204.
- Castro, A.M., Luquetti, A.O., Rassi, A., Rassi, G.G., Chiari, E., Galvão, L.M.C., 2002. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 88, 894-900.
- Chiari, E., Dias, J.C.P., Lana, M., Chiari, C.A., 1989. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 22,19-23.
- Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Méd. Trop. v.38, Supl. III, p.1-29, 2005.
- Coura, J.R., Borges-Pereira, J., Alves-Filho, F.I., Castro, J.A., Cunha, R. V., Costa, W., Junqueira, A.C.V., 1996. Morbidade da doença de Chagas em áreas do Sertão da Paraíba e da Caatinga do Piauí. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 29(2),197-205.
- Dias, J.C.P., Silveira, A.C., Schofield, C.J., 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America – a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97, 603-612.
- Franco, Y.B.A., Silva, I.G., Rassi, A., Rocha, A.C.R.G., Silva, H.H.G., Rassi, G.G., 2002. Correlação entre a positividade do xenodiagnóstico artificial e a quantidade de sangue e triatomíneos utilizados no exame, em pacientes chagásicos crônicos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 35(1), 29-33.
- Freitas, V.L.T., 2009. Avaliação dos níveis de parasitemia por PCR em tempo real em pacientes com doença de Chagas crônica e pacientes com co-infecção HIV – *Trypanosoma cruzi*, com e sem reativação da doença de Chagas. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 97f.
- Gomes, L.M., Macedo, A.M., Vago, A.R., Pena, S.D.J., Galvão, L.M., Chiari, E., 1998. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. Experimental Parasitol. 88, 28-33.
- Gomes M.L.; Galvao, L.M.; Macedo, A.M.; Pena, S.D.; Chiari, E., 1999. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60(2), 205-210.
- Guedes, P.M.M., Veloso, V.M., Caliani, M.V., Carneiro, C.M., Souza, S.M., Lana, M., Chiari, E., Bahia, M.T., Galvão, L.M.C., 2007. *Trypanosoma cruzi* high infectivity in

- vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 102(2), 141-147.
- Gürtler, R.E., Cecere, M.C., Lauricella, M.A., Cardinal, M.V., Kitron, U. & Cohen, J.E., 2007. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. Parasitol. 134(1), 69–82.
- Ikeda-Garcia, F. A., Marcondes, M, 2007. Métodos de diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Rev. Clín. Vet. ano XII, 71, 34-35.
- Junqueira, A.C.V., Chiari, E., Wincher, P., 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 90, 129-132.
- Lucheis, S.B., Da Silva, A.V., Araújo Jr., J.P., Langoni, H., Meira, D.A., Marcondes-Machado, J., 2005. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas disease living in the town of Botucatu and surrounding region, State of São Paulo, Brazil. J. Venomous Anim.Toxins Including Trop. Dis. 11(4), 492-509.
- Luciano, R.M., Lucheis, S.B., Troncarelli M.Z., Luciano, D.M., Langoni, H., 2009. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 46(3), 182-183.
- Meurs, K.M., Anthony, M.A., Slater, M., Miller, M.W., 1998. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection in dogs: 11 cases (1987-1996). JAVMA. 213(4), 497-500.
- Montenegro, V.M., Jiménez, M., Dias, J.C.P., Zeledón, R., 2002. Chagas disease in dogs from endemic áreas of Costa Rica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97(4),491-494.
- Silveira, A.C., Vinhaes, M.C., 1998. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 31(Suppl. II), 15-60.
- Souza, A.I., Oliveira, T.M.F.S., Machado, R.Z., Camacho, A.A., 2009. Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. Pesq. Vet. Bras. 29(2), 150-152.

- Umezawa, E.S., Silveira, J.F., 1999. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94(Suppl. I), 285-288.
- Veloso, V.M., Guedes, P.M.M., Andrade, I.M., Caldas, I.S., Martins, H.R., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L.L., Lana, M., Galvão, L.M.C., Bahia, M.T., Chiari, E., 2008. *Trypanosoma cruzi*: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of Beagle dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 103(6), 528-534.
- Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A., 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. Bull WHO. 53,55-65.
- Williams, G.D., Adams, L.G., Yaeger, R.G., McGrath, R.K., Read, W.K., Bilderback, W.R., 1977. Naturally occurring *Trypanosoma cruzi* (Chagas's disease) in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 171, 171-177.
- Wincker P., Britto C., Pereira J.B., Cardoso M. A., Oelemann W., Morel C.M., 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51(6),771-777.



**Tabela 1.** Resultado da sorologia para doença de Chagas, em valor absoluto (N) e percentagem, de cães provenientes dos municípios de Caicó/RN e Patos e Teixeira/PB, em 2010.

Municípios	Sorologia						Total
	Reagente		Indeterminada		Não reagente		
	N	%	N	%	N	%	
Caicó – RN	6	11,8	34	66,6	11	21,6	51
Patos – PB	6	9,1	46	69,7	14	21,2	66
Teixeira – PB	3	5,7	33	62,3	17	32,0	53
Total	15	8,8	113	66,5	42	24,7	170

**Tabela 2.** Valores absolutos e percentagem de animais positivos (**P**) e negativos (**N**) para *T.cruzi* pelas técnicas de RIFI e ELISA provenientes dos municípios de Caicó/RN e Patos e Teixeira/PB, em 2010.

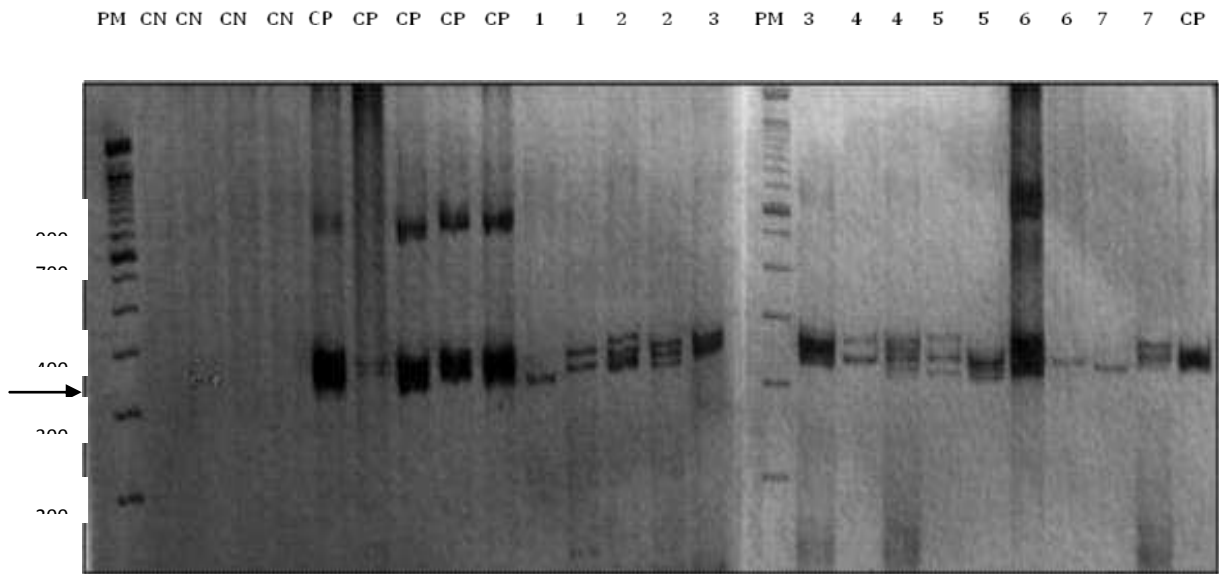
RESULTADO DA SOROLOGIA PARA <i>T.cruzi</i>					
Municípios	RIFI		ELISA		Total por município
	P	N	P	N	
Caicó	6 (11,8%)	45	40 (78%)	11	51
Patos	6 (9,1%)	60	52 (78,7%)	14	66
Teixeira	6 (11,3%)	47	33 (62,2%)	20	53
Total	18	152	125	45	170

**Tabela 3.** Positividade da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da hemocultura (HC) de cães reativos e não reativos sorologicamente para *Trypanosoma cruzi* procedentes do semiárido nordestino

Sorologia	PCR		HC	
	Nº	%	N	%
RIFI +				
Reagente	9/10	90	2/10	20
Indeterminada	2/3	66,6	0/3	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>11/13</b>	<b>84,6</b>	<b>2/13</b>	<b>15,4</b>

**Tabela 4.** Distribuição da reatividade sorológica anti- *Leishmania* spp. em número e percentagem relacionada a reatividade sorológica para *Trypanosoma cruzi* (RIFI e ELISA)

Sorologia para doença de Chagas	Sorologia para leishmaniose visceral					
	RIFI +	%	ELISA S7+	%	RIFI +/ELISA S7+	%
Reagente	4/15	26,6	9/15	60,0	2/15	13,3
Indeterminado	10/113	8,8	25/113	22,1	2/113	1,77
Não reagente	5/42	11,9	8/42	19,0	1/42	2,38
Total	19/170	11,2	42/170	24,7	5/170	2,9



**Figura 1-** Gel de poliacrilamida mostrando a amplificação específica de 330 pb (→) de minicírculos do kDNA do *T.cruzi* em sangue de cães cronicamente infectados. (PM) peso molecular; (CN) controle negativo; (CP) controle positivo; (1-8) amostras de sangue de cães; (PM) marcadores de peso molecular de 100pb.

**4. CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE  
CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Trypanosoma cruzi* NO  
SEMIÁRIDO NORDESTINO**

Manuscrito submetido à Revista Pesquisa  
Veterinária/UFRRJ – Seropédica – ISSN  
0100 – 736X.

## Caracterização clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino<sup>2</sup>

Vanessa L. Santana<sup>3</sup>, Almir P. Souza<sup>2</sup>, Dayanne A.S.D. Lima<sup>2</sup>, Ana L. Araújo<sup>2</sup>, Soraia V. Justiniano<sup>2</sup>, Raiara P. Dantas<sup>2</sup>, Paulo M. M. Guedes<sup>4</sup>, Márcia A. Melo<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Santana V.L., Souza A.P., Lima D.A.S.D., Araújo, A.L., Justiniano S.V., Dantas, R.P., Almeida, M.M. & Câmara, A.C.J. 2010. [**Clinical and laboratorial characterization of naturally infected *Trypanosoma cruzi* dogs in the northeastern semi-arid**] Caracterização clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Av. Universitária, s/n. Bairro Sta. Cecília, Patos, PB 58.708-110, Brazil. E-mail: [almir@cstr.ufcg.edu.br](mailto:almir@cstr.ufcg.edu.br)

This study aimed to highlight the clinical and laboratorial signs of this disease to help characterize this illness in a natural way in the semiarid in the northeastern region. We evaluated 10 positive for *Trypanosoma cruzi* dogs, that were identified by serological analysis of Immunofluorescence Assay (RIFI) and Enzyme Linked immunosorbent Assay (ELISA); molecular analysis by polymerase chain reaction (PCR), direct microscopy and blood culture. The chagasic animals underwent physical examination, electrocardiographic, radiographic, blood pressure, hematology (erythrocyte and leukocyte count) and biochemical exams (urea, creatinine, ALT, AST, PT, albumin, globulin, CK,CK-MB, and cTnl). The physical examination and the blood pressure were presented within the normal range, while in the electrocardiography the FC was observed as normal with a sinus rhythm, with the exception of

---

<sup>2</sup> Recebido em .....

Aceito para publicação em.....

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (UAMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, PB. Av. Universitária, s/n. Bairro Sta. Cecília, Patos - PB, CEP: 58.708-110. \*Autor para correspondência: [almir@cstr.ufcg.edu.br](mailto:almir@cstr.ufcg.edu.br).

<sup>4</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Biociências, Campus Universitário, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN. Av. Salgado Filho, s/n, CEP: 59078-900. E-mail: [pauloguedes@cb.ufrn.br](mailto:pauloguedes@cb.ufrn.br)

one animal that presented a sinus tachycardia (168 bat/min). In the ECG of eight animals there was increase of duration of P ( $47 \pm 6,5\text{ms}$ ) suggestive to atrial enlargement, not confirmed in the radiography. A supraunlevelling was observed in the ST segment in one animal. In the hematological results, thrombocytopenia ( $187,4 \times 10^3 \pm 137,2 \times 10^3$ ) and anemia ( $5,0 \times 10^6 \pm 1,39 \times 10^6 / \text{ul}$ ) were noted. The mean hemoglobin ( $11 \pm 2,7 \text{g/dL}$ ) hematocrit ( $34 \pm 10,5\%$ ) were below normal limits. The white series were within normal variation, with the exception of eosinophilia observed in three animals. Individually, there were two animals which registered leukocytosis, lymphocytosis and neutrophilia. In the biochemical evaluation there was hyperproteinimnia (PT= $7,2 \pm 0,9 \text{g/dL}$ ), hypoalbuminemia ( $2,2 \pm 0,4 \text{g/dL}$ ), hypergammaglobulinemia ( $5,1 \pm 1,0 \text{g/dL}$ ), CK reached average and individual values above reference values ( $196 \pm 171 \text{U/L}$ ) and there was no alteration on ALT and AST enzymes. The CK-MB isoenzymes and cTnI did not change, except in three animals. We conclude that animals naturally infected in the northeastern semiarid present characteristics related to indeterminate chronic form (asymptomatic animals) and that the identification of the naturally infected dogs with no pathognomonic characteristics of the Chagas disease underscores the importance of this illness in the diagnostic process with the other profiles that show nonspecific or not associated to cardiovascular disease.

INDEX TERMS: heart disease, parasite, Chagas Disease, dog.

**RESUMO.-** Objetivou-se, com este estudo, evidenciar os sinais clínicos e laboratoriais desta enfermidade para auxiliar na caracterização da doença de forma natural na área semi-árida da região nordeste. Foram avaliados 10 cães positivos para *Trypanosoma cruzi*, identificados mediante análises sorológicas de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA); análise molecular pela Reação em Cadeia Polimerase (PCR), microscopia direta e hemocultura. Os animais chagásicos foram submetidos à avaliação física, verificação da pressão arterial, exames eletrocardiográficos, radiográficos, hematológicos (eritrograma e leucograma) e bioquímicos (ureia, creatinina, ALT, AST, PT, albumina, globulina, CK, CK-MB e cTnI). O exame físico e os valores das pressões arteriais dos animais apresentaram dentro dos parâmetros de normalidade, enquanto que na eletrocardiografia observou-se FC normal com ritmo sinusal, com exceção de um animal, que apresentou taquicardia sinusal (168 bat/min). No ECG de oito animais houve aumento da duração de P ( $47 \pm 6,5\text{ms}$ ) sugestivo de aumento atrial, não confirmado radiograficamente. Foi observado



supradesnivelamento do segmento ST em um animal. Nos resultados hematológicos constatou-se trombocitopenia ( $187,4 \times 10^3 \pm 137,2 \times 10^3$ ) e anemia ( $5,0 \times 10^6 \pm 1,39 \times 10^6$  uL). Os valores médios da hemoglobina ( $11 \pm 2,7$  g/dL) e do hematócrito ( $34 \pm 10,5\%$ ) estavam abaixo dos limites de normalidade. A série branca apresentou-se dentro dos limites de normalidade, com exceção da eosinofilia observada em três animais. Individualmente, registrou-se em dois animais, leucocitose, linfocitose e neutrofilia. Na avaliação bioquímica, registrou-se hiperproteinemia (PT =  $7,2 \pm 0,9$  g/dL), hipoalbuminemia ( $2,2 \pm 0,4$  g/dL), hiperglobulinemia ( $5,1 \pm 1,0$  g/dL) e aumento da CK ( $196 \pm 171$  U/L). Não houve alteração nas enzimas ALT e AST. A isoenzima CK-MB e o cTnI alteraram somente em três animais. Os animais infectados naturalmente no semiárido nordestino apresentam características relacionáveis à forma crônica indeterminada, ou seja, animais assintomáticos. A identificação dos cães infectados naturalmente sem características patognomônicas da Doença de Chagas ressalta a importância desta enfermidade no processo diagnóstico com as demais que manifestam perfis inespecíficos associados ou não às doenças cardiovasculares.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Cardiopatia, parasito, Doença de Chagas, cão.

## INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada por um protozoário hemoflagelado, o *Trypanosoma cruzi*, e transmitido aos humanos por insetos triatomíneos hematófagos, transplantes de órgãos, transmissão acidental e oral. A infecção através da transfusão de sangue apresenta uma taxa de risco de 12 a 20% a cada 500 mL transfundidos. É endêmica em muitas regiões da América Latina, promovendo um risco de 25% de a população contrair a doença, tendo uma prevalência de 17,4 milhões de casos. (WHO 2002, Carvalho et al. 2003, Gutierrez et al 2009).

Este parasita tem sido detectado em uma ampla variedade de espécies de animais domésticos e selvagens incluindo cães, gatos, roedores e marsupiais (Brener et al. 2000), sendo o cão considerado, em alguns países, como principal reservatório doméstico (Montenegro et al. 2002, Gurtler et al., 2007). Cães e gatos são importantes epidemiologicamente no processo de infecção por insetos, no entanto os residentes das casas e os cães são aproximadamente três vezes mais infectados que os gatos (Gurtler et al. 2007).

Em cães e seres humanos, a doença apresenta quatro formas clínicas: aguda, crônica indeterminada, subaguda e crônica determinada; podendo manifestar lesões cardíacas, digestivas e menos comumente a nervosa (Brener et al. 2000, Camacho et al. 2003). No Brasil,

relacionando aos dados humanos, a forma indeterminada ou assintomática é mais comum em 50-70% dos casos, seguido pelas formas cardíacas e digestivas em 10-40% e 7-11%, respectivamente (Brener et al. 2000,WHO 2002).

Em relação à tripanossomíase canina, Camacho et al. (2003) citam que já foram descritas manifestações agudas e crônicas dessa enfermidade, sendo a doença aguda facilmente observada em cães jovens, entre cinco dias e seis meses de idade. Os animais afetados desenvolvem infecção generalizada, com lesões extensas, de forma predominante no miocárdio e no sistema nervoso central. Caracteriza-se ainda por anorexia, linfadenopatia generalizada, diarreia, miocardite, podendo ocorrer morte súbita decorrente da arritmia grave.

Na fase crônica da doença, o paciente pode manter-se assintomático ou com sinais clínicos relacionados aos distúrbios de ritmo cardíaco (Rossi & Mengel 1992, Camacho et al. 2003), cuja a duração é desconhecida no cão. No entanto, o quadro clínico-patológico varia nas diferentes áreas geográficas e cepas de *T. cruzi* (Camacho et al. 2003).

Segundo Marin-Neto et al. (1999), o uso judicioso de diversos exames laboratoriais como de eletrocardiografia, exame radiográfico torácico e ecocardiografia, visa principalmente indicar a presença de anormalidades anatômicas e funcionais, auxiliando no acompanhamento do grau de acometimento orgânico, da evolução da doença e do possível tratamento.

Desta forma, diante da ausência de dados acerca desta enfermidade em cães da região semiárida do nordeste, objetivou-se com esta pesquisa, evidenciar as alterações clínicas e laboratoriais de cães chagásicos naturalmente infectados, auxiliando assim na caracterização da doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 10 cães positivos para *Trypanosoma cruzi* domiciliados nas áreas rurais nos municípios de Patos, Teixeira no estado da Paraíba e Caicó no estado do Rio Grande do Norte. Os animais foram diagnosticados mediante análises sorológicas da RIFI (reagente  $\geq$  1:20) e ELISA (diluição 1:160, *cut off* = 0,284); PCR, microscopia direta e hemocultura.

Adicionalmente foram realizados testes sorológicos de Imunofluorescência Indireta (RIFI - Biomanguinhos) e o teste Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA S7) para *Leishmania chagasi*. Esses exames sorológicos foram empregados como forma de determinar reações cruzadas ou co-infecções.

Os animais diagnosticados positivos para *T. cruzi* foram submetidos a exame físico (inspeção de mucosas, linfonodos e auscultação torácica), exames para determinação da frequência cardíaca (FC), utilizando-se eletrocardiógrafo computadorizado (TEB – mod. ECGPC VERSÃO 1.10), calculando-a a partir do intervalo RR, registrado em bat/min; frequência respiratória (*f*) obtida por meio da contagem dos movimentos costo-abdominais em um minuto (mov/min); temperatura corporal (T °C) utilizando um termômetro clínico digital (BD DT- 302 – Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda.) o qual foi inserido no reto por aproximadamente dez segundos.

Foi realizada avaliação eletrocardiográfica utilizando o ECG, empregado na derivação II, onde foram avaliados a duração e amplitude da onda P(ms) e P(mV) respectivamente, a duração do complexo QRS (QRSms), a amplitude da onda R (RmV) e os intervalos entre as ondas P e R (PRms), Q e T (QTms) e entre duas ondas R (RRms).

As pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), em mmHg, foram avaliadas empregando-se método indireto com o monitor multiparamétrico (INMAX Color – Instramed Ltda.), cujo manguito de pressão foi adaptado na região umeral ou femural, realizando pelo menos três medidas consecutivas (Nunes 2002).

Para avaliação do tamanho aproximado do coração foi empregado o método do Vertebral Heart Scale System (VHS) (Kealy & McAllister 2005) mediante as radiografias torácicas, obtidas nas projeções dorso-ventral e laterais direita e esquerda.

Amostras de sangue venoso foram colhidas e acondicionadas em tubos com e sem EDTA, os quais foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Clínica do HV/UFCG para realização de hemogramas (eritrograma e leucograma) e a determinação dos parâmetros bioquímicos séricos da atividade enzimática da ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), proteínas totais (PT), albumina e globulina; creatina quinase (CK), creatina quinase fração MB (CK-MB) e complexo troponina I (cTnI). Com exceção desta, realizada por método de quimioluminescência, as demais foram dosadas utilizando-se o método colorimétrico (Kit Labtest Diagnóstica S.A. – Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 – Vista Alegre, Lagoa Santa, MG, Brasil). As leituras foram conduzidas em analisador semi-automático (BIOPLUS - BIO 200FL®). As análises dos soros para troponina cardíaca tipo I foram realizadas no Laboratório Maracondi em São Carlos, SP.

Foi realizado exame parasitológico de fezes como forma de controle e avaliação auxiliar de doenças concomitantes no Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário da UFCG – Campus de Patos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 10 cães que participaram da avaliação clínico-laboratorial apresentavam idade de  $4,2 \pm 1,4$  anos, machos (7/10) e fêmeas (3/10), sem raça definida. Ao exame físico, (Quadro 1) todos os animais apresentaram-se clinicamente normais (mucosas normocoradas, linfonodos com tamanhos normais e móveis, alertas, apetite normal, escore corporal normal, etc.). Em todos os animais observou-se uma FC normal com ritmo sinusal, com exceção de um animal que apresentou taquicardia sinusal (168 bat/min). Tais achados assemelham-se ao registrado por Guedes et al. (2009), que demonstraram que, diferentemente da fase aguda, todos os animais mostraram normalização dos nódulos linfáticos cervicais, fato também relatado por Andrade & Andrade (1980) e Klein & Camacho (1997). Essa ausência de sintomatologia clínica pode ser justificada pelo desconhecimento do período de infecção natural, virulência dependente do tipo de cepa circulante e pela idade dos animais (Guedes et al. 2007, Souza et al. 2008). A idade média dos cães observada nesta pesquisa correspondia a animais adultos, portanto, torna-se mais difícil que os mesmos desenvolvam a fase aguda da doença à semelhança que ocorre em animais jovens, apresentando, assim, sinais menos evidentes (Camacho et al. 2003). Comparativamente aos humanos, Castro et al. (2001) analisou os pacientes chagásicos crônicos e observou que a maior parte deles permaneceram com a forma clínica inalterada e na forma indeterminada.

As médias dos valores das pressões arteriais (PAS -  $138,0 \pm 22,0$ mmHg; PAD -  $86,0 \pm 12$  mmHg; e PAM -  $105,0 \pm 12,0$  mmHg) apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade citados por Camacho et al. (2003). A normalização da pressão arterial em cães chagásicos também foi observada por outros autores (Alves 2003, Souza et al. 2008), podendo se inferir que a idade desses animais pode ter influenciado na manutenção da pressão arterial haja vista que, segundo Bertanha et al. (2008), pacientes humanos chagásicos crônicos com pressão normal apresentavam-se com menos idade que os chagásicos hipertensos. A pressão normal em chagásicos desacelera danos cardiovasculares, reduzindo a progressão da doença para cardiopatias e alterações eletrocardiográficas.

Nenhum dos animais manifestou sinais de congestão (ascite, edema pulmonar, cianose, pulso jugular positivo, efusão pericárdica, etc.), os quais são decorrentes de insuficiência cardíaca, não observada também por Andrade & Andrade (1980) quando experimentalmente 10 animais evoluíram para a fase crônica indeterminada da infecção.

As projeções realizadas para avaliação radiográfica dos animais não demonstraram nenhuma alteração e isso contrasta com a avaliação eletrocardiográfica, cujos valores sugerem, de acordo com Tilley & Goodwin (2002), aumento atrial por apresentarem Pms com média  $47 \pm 6,5$ ms. A elevação na duração da onda P em cães chagásicos sem aumento na silhueta cardíaca também foi registrado por Souza et al. (2008), contradizendo os achados de Klein & Camacho (1997) e Pascon et al. (2010).

As alterações eletrocardiográficas (Quadro 2) observadas neste estudo foram discretas e com poucas exceções estiveram dentro dos limites da normalidade. Outrossim, estudos experimentais observam que a cronicidade da infecção leva à redução ou desaparecimento de alterações no sistema excito-condutor, principalmente as arritmias (Barr et al. 1992, Souza et al. 2008), fato também observado em humanos (Castro et al. 2001).

Foi observado no animal C8 supradesnivelamento do segmento ST, que variou, nos três momentos registrados, de 0,16 a 0,23mV. Apesar de ter se registrado supradesnivelamento deve-se salientar que este achado não pode ser caracterizado como oriundo de lesões típicas do miocárdio, como hipóxia e isquemia (Tilley & Goodwin 2002), haja vista que os marcadores empregados para identificar lesões cardíacas, a isoenzima CK-MB e cTnI, mantiveram-se normais.

Em relação às variáveis hematológicas, 60% e 70% dos animais apresentaram trombocitopenia e anemia, respectivamente. Os valores médios da hemoglobina e hematócrito estiveram abaixo dos limites de normalidade (Quadro 3). Os animais apresentaram valores médios de trombócitos, eritrócitos, hemoglobina e hematócrito abaixo dos limites considerados normais para a espécie, tendo a maioria apresentado anemia do tipo normocítica normocrômica, como relatado por Rashid et al. (2008). Por outro lado, Klein & Camacho (1997) verificaram tais achados apenas na fase aguda da doença. A trombocitopenia também foi observada em cães por Lana et al. (1989) e em macacos por Cardoso & Brener (1980). Esta redução de plaquetas na corrente sanguínea sugere que a causa possa ser decorrente, dentre outras causas, de uma deficiência plaquetária primária com a participação de imuno-complexos ou sistema complemento, do tipo de cepa, bem como da parasitemia por *T. cruzi* (Cardoso & Brener 1980). Importante registrar que em dois animais deste estudo (C1 e C4) houve infecção concomitante por *Babesia* sp. e *Anaplasma platys* que podem ter agravado o quadro plaquetário.

Na avaliação do leucograma observaram-se valores médios dentro dos limites de normalidade, com exceção dos eosinófilos, cujas médias registradas estavam elevadas (Quadro 4).

A eosinofilia observada em três animais determinou a elevação da média geral do grupo estudado. Tal elevação dos eosinófilos ocorreu pela presença de parasitas intestinais em dois destes animais com eosinofilia, devido a essas células serem responsáveis pelo mecanismo de defesa contra os estágios larvários de parasitas (Trall et al. 2006). Adicionalmente, a eosinofilia está relacionada às respostas imunes dos cães chagásicos crônicos (Lana et al. 1989) aos parasitas de *T.cruzi* (Guedes et al. 2009).

Três animais apresentaram leucocitose, dois com linfocitose e outro com neutrofilia. Esses achados também foram observados por Lana et al.(1989) e Barr et al. (1991) em cães tanto na fase aguda como crônica e estão relacionados à inflamação decorridos da infecção por *T. cruzi*.

Na avaliação bioquímica (Quadro 5), a ureia e a creatinina apresentaram-se com valores individuais e médios nos padrões normais, no entanto, os valores médios demonstraram uma hiperproteinemia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. Essa hiperproteinemia também registrada em tamarins leão dourado (Monteiro et al. 2006), sugere um provável reflexo da resposta humoral causada pela infecção por *T. cruzi*, confirmado pela hiperglobulinemia. Assim como nos humanos, nos cães após a fase aguda decrescem também os níveis de imunoglobulinas da classe M e sobem os níveis de IgG, que com a cronicidade da infecção inicia o decréscimo e tendem a estabilizar, auxiliando na identificação da transição para a fase crônica (Lana et al. 1992, Brener et al. 2000, Guedes et al. 2002).

A atividade sérica da enzima CK alcançou valores médios e individuais acima dos valores de referência ( $196 \pm 171$ U/L) citados por Lopes et al. (2005). O mesmo não ocorreu com as enzimas ALT, AST e os marcadores cardíacos. No entanto, individualmente, valores de CK-MB dos animais C7, C8 e C11 alcançaram uma dosagem acima da referência. As médias de cTnI também foi registrada nos limites de normalidade, segundo Sleeper et al. (2001) e Santos (2005). O valor médio da atividade enzimática da CK apresentou-se aumentado, mas não foi observado nenhum comprometimento muscular, ósseo ou hepático nos animais deste estudo que justificassem tal elevação, visto que as médias de ALT e AST encontravam-se normais. Estes achados diferem daqueles obtidos por Barr et al. (1991), que registraram essas enzimas em concentrações altas. Em relação aos resultados obtidos para CK-MB neste estudo, os mesmos estão de acordo com os obtidos por Monteiro et al. (2006), mas divergem daqueles registrados por Souza et al. (2008) em cães naturalmente infectados.

Apesar de apenas a enzima CK ter apresentado médias acima dos limites da normalidade e somente três animais individualmente alcançarem atividade enzimática de CK-MB acima do

normal, pode-se inferir que o parasitismo tecidual do *T. cruzi* no tecido miocárdico não seja a principal causa de miocardite. Ela também pode ser decorrente de outros mecanismos, como a resposta imunológica, incluindo a celular e humoral (Pascon et al. 2010), com consequentes lesões miocárdicas tanto na fase aguda como crônica (Rossi & Mengel 1992). Nos animais que apresentaram valores de CK e CK-MB acima dos níveis normais pode sugerir lesão cardíaca (Souza et al. 2008) e, apesar, da dosagem por quimioluminescência de cTnI, ser considerada mais sensível e específica que a CK-MB, esta apresentou valores normais devido sua maior presteza em diagnóstico de lesões agudas que nas crônicas (Tarducci et al. 2004).

## CONCLUSÃO

Os animais infectados naturalmente no semiárido nordestino apresentam características relacionáveis à forma crônica indeterminada, ou seja, animais assintomáticos.

A ausência de manifestações clínicas evidentes da Doença de Chagas, ressalta a importância desta enfermidade no processo de diagnóstico diferencial com as demais que manifestam perfis inespecíficos, associados ou não a doenças cardiovasculares.

**Agradecimentos-** À Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba, à Prof<sup>a</sup> Lúcia Maria C. Galvão da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

## REFERÊNCIAS

- Alves R.O. 2003. Avaliações ecodopplercardiográfica, eletrocardiográfica computadorizada e dinâmica (Sistema Holter) e clínico-patológica em cães com cardiopatia chagásica experimental. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 89p.
- Andrade Z.A. & Andrade S.G. 1980. A patologia da doença de chagas experimental no cão. Mem Inst. Oswaldo Cruz. 75 (3-4): 77-95.
- Barr S.C., Gosset K.A. & Klei T.R. 1991. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observation of trypanosomiasis in dog infected with North American Trypanosoma cruzi isolates. American Journal of Veterinary Research. 52(6): 954-960.

- Barr S.C., Holmes R.A. & Klei T.R. 1992. Electrocardiographic and echocardiographic features of trypanosomiasis in dog inoculated with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. *American Journal of Veterinary Research*. 53(4):521-527.
- Bertanha L., Guariento M.E., Magna L.A. & Almeida E.A. 2008. Caracterização clínico-laboratorial de chagásicos hipertensos sem insuficiência cardíaca manifesta. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41(2): 163-168.
- Brener Z., Andrade Z. A. & Barral-Neto M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 430p.
- Camacho A. A., Mucha C. J. & Belerenian G. C. 2003. Afecções Cardiovasculares em Pequenos Animais. Interbook, São Paulo, 328p.
- Cardoso J.E. & Brener Z. 1980. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 75(3-4): 97-104.
- Carvalho C.M.E., Andrade M.C.R., Xavier S.S., Mangia R.H.R., Britto C.C., Jansen A.M., Fernandes O., Lannes-Vieira J. & Bonecini-Almeida M.G. 2003. Chronic Chagas's disease in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): Evaluation of parasitemia, serology, eletrocardiography, echocardiography, and radiology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68(6):683-691.
- Castro C., Prata A. & Macêdo V. 2001. Estudo clínico durante 13 anos de 190 chagásicos crônicos de Mambá, Goiás, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34(4): 309-318.
- Guedes P.M.M., Veloso V.M., Tafuri W.L., Galvão L.M.C., Carneiro C.M., Lana M., Chiari E., Soares K. A. & Bahia M.T. 2002. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Tropica*. 84: 9-17.
- Guedes P.M.M., Veloso V.M., Caliari M.V., Carneiro C.M., Souza S.M., Lana M., Chiari E., Bahia M.T. & Galvão L.M.C. 2007. *Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 102(2): 141-147.
- Guedes P.M.M., Veloso V.M., Afonso L.C.C., Caliari M.V., Carneiro C.M., Diniz L.F., Marques-da-Silva E.A., Caldas I.S., Mata M.A.V., Souza S.M., Lana M., Chiari E., Galvão L.M.C. & Bahia M.T. 2009. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and low IL-10 production during the acute infection phase. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 130: 43-52.



- Gurtler R.E., Cecere M.C., Lauricella M.A., Cardinal M.V., Kitron U. & Cohen J.E. 2007. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*.134(1): 69–82.
- Gutierrez F.R.S., Guedes P.M.M., Gazzinelli R.T. & Silva J.S. 2009. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology*. 31: 673-685.
- Kealy J. K. & McAllister H. 2005. Radiologia e ultra-sonografia do cão e do gato. 3ed. Manole, São Paulo, p.149-226.
- Klein R.P. & Camacho A.A. 1997. Eletrocardiographic evaluation of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* during the acute and indeterminate chronic phases of infection. *Braz. J.vet.Res.anim. Sci.* 34(6):337-344.
- Lana M., Tafuri W.L., Toledo M.J.O. & Veloso V.M. 1989. Alterações hematológicas em cães infectados com as cepas Be-62 e Be-78 de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 22(supl.): 168.
- Lana M., Chiari E. & Tafuri W.L. 1992. Doença de Chagas experimental em cães. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87(1):59-71.
- Lopes S.T.A., Franciscato C., Teixeira L.V., Oliveira T.G.M., Garmatz B.C., Veiga A.P.M. & Mazzanti A. 2005. Determinação da creatina quinase em cães. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia.* 12(1): 31-37.
- Marin-Neto J.A., Simões M.V. & Sarabanda A.V.L. 1999. Cardiopatia chagásica. *Arq. Bras. Cardiol.* 72(3): 247-263.
- Monteiro R.V., Baldez J., Dietz J., Baker A., Lisboa C.V. & Jansen A.M. 2006. Clinical, biochemical, and electrocardiographic aspects of *Trypanosoma cruzi* infection in free-ranging golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). *J. Med. Primatol.* 35: 48-55.
- Montenegro V.M., Jiménez M., Dias J.C.P. & Zeledón R. 2002. Chagas disease in dogs from endemic áreas of Costa Rica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97(4): 491-494.
- Nunes N. 2002. Monitoração da anestesia, p. 64 – 81. In: Fantoni D. T. & Cortopassi S.R.G. 2002. Anestesia em cães e gatos. Roca, São Paulo, 389p.
- Pascon J.P.E., Neto G.B.P., Sousa M.G., Júnior D. P. & Camacho A.A. 2010. Clinical characterization of chronic chagasic cardiomyopathy in dogs. *Pesq. Vet. Bras.* 30(2): 115-120.
- Rashid A., Rasheed K. & Hussain A. 2008. Trypanosomiasis in dog; a case report. *Iranian Journal of Arthropod – Borne Disease.* 2(2): 48-51.

- Rossi M.A. & Mengel J.O. 1992. Patogênese da miocardite chagásica crônica: o papel de fatores autoimunes e microvasculares. *Rev. Inst. Med. Trop.* 34(6): 593-599.
- Santos A.L.F. 2005. Dosagem sérica da enzima creatinofosfoquinase – isoenzima MB (CK-MB) e de troponina I (cTnI) de cães eletrocardiograficamente normais e naqueles com desníveis (infra e supra) do segmento ST, utilizando ensaio imunométrico por quimioluminescência. Dissertação de Mestrado em Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 61p.
- Sleeper M.M., Clifford C.A. & Laster L.L. 2001. Cardiac troponin I in the normal dog and cat. *J. Vet. Intern. Med.* 15:501-503.
- Souza A.I., Paulino-Junior D., Sousa M.G. & Camacho A.A. 2008. Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. *Ciência Rural.* 38(5): 1351-1356.
- Tarducci A., Abate O., Borgarelli M., Borrelli A., Zanatta R. & Cagnasso A. 2004. Serum values of cardiac troponin – T in normal and cardiomyopathic dogs. *Veterinary Researche Communications.* 28: 385-388.
- Tilley L.P. & Goodwin J.K. 2002. *Manual de Cardiologia para Cães e Gatos.* 3 ed. Roca, São Paulo, 489p.
- Trall M.A., Baker D.C., Campbell T.W., DeNicola D., Fettman M.J., Lassen E.D., Rebar A. & Weiser G. 2006. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária.* Roca, São Paulo, 582p.
- World Health Organization (WHO). 2002. Control of Chagas disease. WHO Tech Rep Ser. 905: i-vi, 1-109.

**Quadro 1.** Resultados clínicos de cães infectados naturalmente pelo *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino realizados no Hospital Veterinário – UFCG, Campus de Patos, 2010.

<b>Animais</b>	Idade (anos)	Sexo	FC (bat./min)	FR (mov./min)	TR (°C)	PAS	PAD	PAM	VHS
1	5	F	131	40	38,7	123	93	102	10,8
2	4	M	117	68	39,1	158	112	128	10,2
4	6	M	102	24	38,4	115	79	91	10,0
5	4	M	93	32	38,5	122	82	97	10,0
6	3	F	101	24	38,2	136	80	104	10,0
7	2	F	142	32	39,0	186	90	119	9,0
8	2	M	168	72	39,1	145	75	110	10,5
9	6	M	87	32	37,7	141	95	114	9,5
10	5	M	112	24	38,2	116	77	91	9,0
11	5	M	98	24	39,2	140	75	94	10,0
<b>Média</b>	4,2		115	37	38,6	138	86	105	9,9
<b>± SD</b>	1,5		25	18	0,5	22	12	13	0,6

FC = frequência cardíaca; FR= frequência respiratória; TR= temperatura retal; PAS=pressão arterial sistólica; PAD= pressão arterial diastólica; PAM= pressão arterial média.

**Quadro 2.** Resultados eletrocardiográficos de cães infectados naturalmente pelo *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino realizados no Hospital Veterinário – UFCG, Campus de Patos, 2010.

<b>Animais</b>	<b>PmV</b>	<b>Pms</b>	<b>PR</b>	<b>QRS</b>	<b>RR</b>	<b>RmV</b>	<b>QT</b>	<b>T</b> (<25%)
1	0,17	47	100	30	913	0,44	187	<25%
2	0,13	50	120	37	1020	0,79	180	<25%
4	0,12	40	130	37	1173	1,04	210	<25%
5	0,16	47	133	30	1277	0,57	200	<25%
6	0,2	60	123	30	1183	0,54	227	<25%
7	0,12	47	100	33	840	0,45	173	<25%
8	0,15	53	123	33	713	1,13	180	<25%
9	0,1	43	97	30	1357	0,54	217	<25%
10	0,13	47	110	40	1063	1,14	210	<25%
11	0,22	37	103	30	1147	0,75	197	<25%
<b>Média</b>	0,15	47	114	33	1.069	1	198	
<b>± SD</b>	0,0	6,5	13,5	3,7	200,6	0,3	17,9	

PmV = amplitude da onda P em milivolts, Pms = duração da onda P em milisegundos, PR = intervalo entre as ondas P e R em milisegundos, QRS = duração do complexo QRS em segundos, RR = intervalo entre duas ondas R em milisegundos, RmV = amplitude da onda R em milivolts, QT = duração do intervalo QT em milisegundos, T = amplitude da onda T.

**Quadro 3.** Resultados do eritrograma de cães infectados naturalmente pelo *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino realizados no Hospital Veterinário – UFCG, Campus de Patos, 2010.

<b>Animais</b>	Eritrócito (uL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VGM (fL)	CHCM (%)	PLAQ (mm <sup>3</sup> )
1	3.750.000	8,5	24	64	35,41	52.000
2	4.840.000	10,3	33	68,7	31,2	62.400
4	4.630.000	11,8	31	67,3	38	101.000
5	4.750.000	9,1	23	48,9	21,1	127.000
6	7.100.000	13,9	43	60,5	32,3	390.000
7	4.800.000	10,1	31	64,5	32,5	437.000
8	5.800.000	12	35	60,3	34,2	186.000
9	5.140.000	12	37	72,5	32,4	128.000
10	5.900.000	15,1	50	84,7	15,1	289.000
11	3.720.000	10,8	33	89,1	32,7	102.000
<b>Média</b>	5.043.000	11	34	68	30	187.440
<b>± SD</b>	1.018.005	2,0	8,1	12	7,0	137.261

Hb = hemoglobina, Ht = hematócrito, VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, plaq. = plaquetas

**Quadro 4.** Resultados do leucograma realizado de cães infectados naturalmente pelo *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino realizados no Hospital Veterinário – UFCG, Campus de Patos, 2010.

<b>Animais</b>	<b>LEUC (uL)</b>	<b>NS (%)</b>	<b>NS (Abs)</b>	<b>NB (%)</b>	<b>NB (Abs)</b>	<b>EOS (%)</b>	<b>EOS (Abs)</b>	<b>LINF (%)</b>	<b>LINF (Abs)</b>	<b>MON (%)</b>	<b>MON (Abs)</b>	<b>BAS (%)</b>
1	9.000	91	8190	0	0	0	0	7	630	2	180	0
2	11.200	58	6.496	0	0	7	784	29	3.248	6	672	0
4	15.200	65	9.880	0	0	3	456	23	3.496	5	625	0
5	5.900	61	3.599	0	0	5	295	32	1.888	1	59	0
6	11.800	58	6.844	0	0	26	3.068	14	1.652	2	236	0
7	29.950	58	17.371	0	0	30	8.985	12	3.594	0	0	0
8	10.750	84	9.030	2	215	1	108	10	1.080	3	323	0
9	21.400	49	10.486	1	214	6	1.284	42	8.988	2	428	0
10	16.400	55	9.200	1	164	28	4.756	15	2.460	1	164	0
11	17.650	51	9.270	0	0	5	885	43	7.611	1	177	0
<b>Média</b>	14.925	63	9.037	0,4	59,3	11	2.062	23	3.465	2	286	0
<b>± SD</b>	6952	14	3557	1	96	12	2860	13	2754	2	226	0

NS = neutrófilo segmentado, NB = bastonetes, EOS = eosinófilos, LINF = linfócitos, MON = monócitos, BAS = bastonetes, Abs = valor absoluto, % = valor relativo

**Quadro 5.** Resultados das análises bioquímicas de cães infectados naturalmente pelo *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino realizados no Hospital Veterinário – UFCG, Campus de Patos, 2010.

<b>Animais</b>	ureia (g/dL)	creat. (mg/dL)	PT (d/dL)	Alb. (g/dL)	Glob. (g/dL)	ALT (U/mL)	AST (U/dL)	CK (U/L)	CK-MB (U/L)	cTnI (ng/mL)
1	34	0,7	8,1	1,69	6,41	47	26	72	14,2	0,06
2	46	0,9	8,2	1,74	6,46	26	41	97	24,0	0,06
4	36	0,8	7,1	2,34	4,76	31	20	72	31,2	0,06
5	25	1,0	7,1	1,88	5,22	20	36	145	31,8	0,06
6	40	1,0	6,6	3,01	3,59	52	26	72	13,2	0,06
7	24	0,9	5,5	2,07	3,43	31	36	315	47,4	0,06
8	24	0,8	8,4	2,56	5,84	31	115	607	56,4	0,06
9	40	1,1	7,1	2,36	4,74	26	20	121	14,6	0,06
10	32	1,0	6,8	1,88	4,92	52	31	145	22,0	0,06
11	37	1,0	7,5	2,13	5,37	83	31	315	52,8	0,06
<b>Média</b>	34	0,9	7,2	2,2	5,1	40	38	196	30,8	0,06
<b>± SD</b>	7,6	0,1	0,9	0,4	1,0	19	28	171	16,3	0,0

creat. = creatinina, PT = proteína total, Alb. = albumina, Glob.= globulina, ALT = alanina aminotransferase, AST= aspartato aminotransferase, CK = creatinoquinase, CK-MB = creatinoquinase isoenzima MB, cTnI = complexo troponina I

## **6. ANEXO**





## Capítulo I

**Tabela 1.** Distribuição da reatividade sorológica anti-*Trypanosoma cruzi* quanto a positividade e negatividade dos exames de RIFI e ELISA de cães por município infectados naturalmente no semi-árido nordestino

<b>Testes sorológicos</b>				
Municípios	<i>Trypanosoma cruzi</i>			
	RIFI +/ELISA+	RIFI+/ELISA-	RIFI - / ELISA +	RIFI - /ELISA -
Caicó	6	0	34	11
Patos	6	0	46	14
Texeira	3	3	30	17
Total	15	3	110	42

**Tabela 2.** Distribuição da reatividade sorológica anti- *Leishmania* spp. quanto a positividade e negatividade dos exames de RIFI e ELISA de cães por município infectados naturalmente no semi-árido nordestino

<b>Testes sorológicos</b>				
Municípios	<i>Leishmania</i> spp.			
	RIFI +/ELISA+	RIFI+/ELISA-	RIFI - / ELISA +	RIFI - /ELISA -
Caicó	2	9	7	33
Patos	2	1	15	48
Texeira	1	4	15	33
Total	5	14	37	114

**NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO NA REVISTA VETERINARY  
PARASITOLOGY**

# Veterinary Parasitology - Guide for Authors

An international scientific journal and the Official Organ of the [American Association of Veterinary Parasitologists \(AAVP\)](#), the [European Veterinary Parasitology College \(EVPC\)](#) and the [World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology \(WAAVP\)](#).

## Veterinary Parasitology

### Types of contributions

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Rapid Communications
4. Short Communications
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

*Original research papers* should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

*Review articles* should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

*Rapid Communications* should contain information of high 'news'/scientific value worthy of very rapid publication. Rapid Communications should be submitted to the journal as such (i.e. clearly labelled as a RC) and should, in general, not exceed 2000 words in length. Upon receipt, they will be subject to rapid assessment and if accepted, published with priority.

*Short Communications* should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.

*Letters to the Editor* offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

*Book Reviews* will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Dr F.H.M. Borgsteede  
Animal Sciences Group, Wageningen UR  
Division Infectious Diseases  
Laboratory of Parasitic Diseases  
P.O. Box 65  
8200 AB Lelystad  
The Netherlands

### Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Parasitology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetpar>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a

given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to [AuthorSupport@elsevier.com](mailto:AuthorSupport@elsevier.com). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

#### **Acknowledgements**

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

#### **Conflict of interest**

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

#### **Role of the funding source**

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

#### **Ethics**

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL:

➡ [http://www.cioms.ch/frame\\_1985\\_texts\\_of\\_guidelines.htm](http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm). Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Parasitology*.

#### **Preparation of manuscripts**

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

*Language Editing:* [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit

their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. Authors should also be aware that *The Lucidus Consultancy* [edit@lucidusconsultancy.com](mailto:edit@lucidusconsultancy.com) offers a bespoke service to putative contributors to Veterinary Parasitology who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com).

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

### **Abstracts**

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

### **Tables**

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.

5. Each table should have a brief and self-explanatory title.

6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the

bottom of the table.

## Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. *Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.*
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:

➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

## Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect:

➡ <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit

➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

## References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. *For periodicals*

Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.

b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical*

Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruysse, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.

c. *For books*

Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

d. *For multi-author books*

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

### Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ , not as  $\text{Ca}^{++}$ .

6. Isotope numbers should precede the symbols e.g.  $^{18}\text{O}$ .

7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as  $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

### Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.

2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

### Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied*



*Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are requested to follow the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299–326).

## Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail [healthpermissions@elsevier.com](mailto:healthpermissions@elsevier.com). Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

## Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on [elsevier.com](http://elsevier.com))
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

## Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

## Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use

the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Author Services**

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113, [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com).

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage → <http://www.elsevier.com/locate/vetpar> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

### ***Veterinary Parasitology* has no page charges**

**NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA  
BRASILEIRA**

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <[jurgen.dobereiner@terra.com.br](mailto:jurgen.dobereiner@terra.com.br)>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras "pesadas"), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Dobereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. **Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia somente os da área de Animais Selvagens serão recebidos para submissão.**

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

**NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 120,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.**

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

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

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

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

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

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

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

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

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

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

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

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

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

Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

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

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

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

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails de outros autores;

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

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

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

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

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

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.