



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria
Brasil

Silva, Aleksandro Schafer da; Wolkmer, Patrícia; Gressler, Lucas Trevisan; Otto, Mateus Anderson;
Bess, Franciele; Tavares, Kaio César Simiano; Zanette, Régis Adriel; Monteiro, Silvia Gonzalez
Patogenicidade de um isolado de Trypanosoma evansi em ratos inoculados com o parasito em
sangue in natura e criopreservado

Ciência Rural, vol. 39, núm. 6, septiembre, 2009, pp. 1842-1846
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33113644031>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Patogenicidade de um isolado de *Trypanosoma evansi* em ratos inoculados com o parasito em sangue *in natura* e criopreservado

Trypanosoma evansi pathogenicity strain in rats inoculated with parasite in fresh and cryopreserved blood

Aleksandro Schafer da Silva^I Patrícia Wolkmer^I Lucas Trevisan Gressler^{II}
Mateus Anderson Otto^{II} Franciele Bess^{II} Kaio César Simiano Tavares^{III}
Régis Adriel Zanette^{IV} Silvia Gonzalez Monteiro^V

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a patogenicidade do isolado de *Trypanosoma evansi* (LPV-2005), em ratos (*Rattus norvegicus*), sob influência da imunidade passiva, de diferentes concentrações e de meios de conservação. Para tanto, foram utilizados 36 *Rattus norvegicus*, fêmeas, separados em seis grupos homogêneos. Os roedores dos grupos A e B foram infectados com 10^5 *T. evansi*, e os animais dos grupos C e D foram infectados com 10^6 tripomastigotas/animal. Os grupos E e F foram utilizados como grupo controle negativo, isto é, inoculados com sangue *in natura* e criopreservado sem o parasito, respectivamente. O grupo A foi formado por ratos filhos de fêmeas infectadas com protozoário, mas curadas após tratamento. Os grupos B, C e D continham roedores que nunca tiveram contato com o isolado LPV-2005. Os grupos B e C diferiram quanto à dose inoculada do flagelado mantida em cultura viva (ratos Wistar). Já os ratos do grupo D foram infectados com sangue criopreservado em nitrogênio líquido. A patogenicidade do isolado foi avaliada a partir do período pré-patente, da evolução da parasitemia e da longevidade dos animais. O grupo D apresentou um período pré-patente superior aos demais grupos. Em relação à longevidade dos animais de cada grupo, foi verificada diferença estatística significativa ($P < 0,05$). O grupo D apresentou um período de vida de 27,8 dias, e o grupo C, de apenas 4,8 dias. Os ratos de ambos os grupos controle mantiveram-se vivos por 50 dias, quando foram eutanasiados. Portanto, a preservação do inóculo testado e a dose infectante de *T. evansi* influenciam a patogenicidade do isolado LPV-2005 para ratos. A presença de anticorpos maternos em ratos não impede a infecção e mortalidade por *T. evansi*.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the *Trypanosoma evansi* strain pathogenicity (LPV-2005) in rats under passive immunity influence, of different concentrations and media preservation. Thirty six adult female *Rattus norvegicus* were separated in six equal groups. Groups A and B were inoculated with 10^5 *T. evansi* and groups C and D with 10^6 blood trypomastigotes per animal. Groups E and F were used as negative control in which the animals were inoculated with fresh and cryopreserved blood, without the parasite. Group A were composed of *T. evansi* infected born rats and cured females. Groups B, C and D were composed with animals never exposed to the LPV-2005 strain. All groups B and C animals received different doses of blood trypomastigotes kept in Wistar rats, while animals from group D were infected with cryopreserved blood kept in liquid nitrogen. The strain pathogenicity was estimated by prepatency evaluation period, levels of parasitemia and animals longevity. Group D showed a longer prepatency period in comparison with other groups. The longevity of group D (27.8 days) was significantly different ($P < 0.05$) from group C (4.8 days). Rats of the control group were euthanized 50 days postinfection. In conclusion, the tested inoculum-preservation methods and the infective dose of *T. evansi* influenced the pathogenicity of the LPV-2005 strain in rats. The presence of maternal antibodies did not prevent the infection and mortality of the rats by *T. evansi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma evansi*, virulência, roedores.

Key words: *Trypanosoma evansi*, virulence, rodents.

^IPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{II}Curso de Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{III}Curso de Medicina Veterinária, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brasil.

^{IV}Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^VDepartamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM, Faixa de Camobi, km 9, Campus Universitário, Prédio 20, Sala 4232, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: sgmonteiro@uol.com.br. Autor para correspondência.

INTRODUÇÃO

Trypanosoma evansi é um protozoário digenético da seção salivaria, agente etiológico da doença conhecida como Mal das cadeiras ou surra em equinos (SILVA et al., 2002). Apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ocorrer na África, Ásia, América Central e do Sul. Comumente é observado parasitando diversas espécies de animais domésticos e silvestres (SILVA et al., 2002). Os humanos eram considerados refratários à infecção por *T. evansi* (KUBIAK & MOLFI, 1954). Entretanto, JOSHI et al. (2005) recentemente relataram o primeiro caso de infecção pelo parasito em um fazendeiro, na Índia.

Os tripomastigotas presentes nos vasos sanguíneos de vertebrados são adquiridos por insetos durante a ingestão de sangue contaminado, sendo a transmissão atribuída principalmente aos tabanídeos (*Tabanus* sp., *Chrysops* sp. e *Hematopota* sp.). Há também a possibilidade de transmissão por morcegos hematófagos (HOARE, 1972) e sanguessugas (CARREIRA, 2005). A doença causada por esse protozoário é caracterizada por rápida perda de peso, graus variáveis de anemia, febre intermitente, edema dos membros pélvicos e das partes baixas do corpo e fraqueza progressiva (HERRERA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2005).

RODRIGUES et al. (2005), a partir de um surto no Rio Grande do Sul, sugeriram que a elevada mortalidade dos equinos no Estado ocorreu em virtude da ausência de anticorpos dos animais para o flagelado. No Pantanal Mato-grossense, a tripanossomose é uma doença endêmica para equinos, cães, bovinos e animais silvestres, em que grande parte dos animais infectados não morre em decorrência da doença (SILVA et al., 2002). Em estudos já realizados com a cepa LPV-2005, foi verificada elevada patogenicidade do protozoário, tendo em vista que os ratos morreram, em média, quatro dias após inoculação (DOYLE et al., 2007), enquanto em outros foi verificada uma longevidade acima de 40 dias para ratos (QUEIROZ et al., 2000; OMER et al., 2007), demonstrando a variável suscetibilidade dos ratos, dependendo da cepa utilizada (QUEIROZ et al., 2000; CARMONA et al., 2006). Em virtude disso, este trabalho teve o objetivo de investigar a patogenicidade do isolado de *T. evansi* (LPV-2005), em ratos (*Rattus norvergicus*), sob influência da imunidade passiva, de diferentes concentrações e de meios de conservação do protozoário.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em biotério experimental climatizado (25°C; 70% UR). Foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvergicus*), fêmeas, separados em seis grupos com seis animais cada. Estes foram vermifugados (fenbendazol) 15 dias antes de iniciar a pesquisa e alimentados diariamente com ração comercial e água à vontade.

O isolado de *T. evansi* do Laboratório de Parasitologia Veterinária do ano de 2005 (LPV-2005) utilizado no trabalho foi oriundo de um cão naturalmente infectado do Município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul (RS) (COLPO et al., 2005), mantido no laboratório em nitrogênio líquido e em cultura viva por passagens seriadas em ratos Wistar, de acordo com SILVA et al. (2002). Os ratos foram inoculados via intraperitoneal com 0,2ml de sangue contendo as concentrações de 10^5 (grupos A e B) e 10^6 (grupos C e D) tripomastigotas por animal. A quantificação de protozoários por mililitro de sangue foi feita em câmara de Neubauer, e a concentração de parasito foi ajustada com diluição em solução fisiológica estéril (ASSOKU, 1975). Os grupos E e F, utilizados como controles negativos, receberam a mesma dose de sangue *in natura* e criopreservado de ratos livres do parasitismo, respectivamente.

Todos os ratos do experimento apresentavam 30 dias de vida no dia da inoculação. O grupo A foi formado por ratos filhos de fêmeas infectadas com *T. evansi* que foram medicados com aceturato de diminazeno ($3,5\text{mg kg}^{-1}$) durante a gestação e amamentação dos filhotes para controlar a parasitemia. Os filhotes foram inoculados 10 dias após cessar a ingestão de leite materno, período em que, segundo pesquisador, são encontrados antitripanossomas na circulação (GILL, 1971). Nesse grupo, buscou-se verificar se a transmissão de anticorpos ou imunoglobulinas materna interfere na evolução da parasitemia pelo protozoário nos filhotes. Os grupos B e C continham ratos que não tiveram contato com *T. evansi*, diferindo entre si com relação à dose do parasito inoculada, isto é, 10^5 e 10^6 , respectivamente. Os animais do grupo D foram inoculados com sangue criopreservado em nitrogênio líquido por 10 dias, ao contrário dos grupos A, B e C, que receberam sangue *in natura* obtido de ratos Wistar parasitados. O inóculo em nitrogênio foi administrado 10 minutos após descongelamento.

Após inoculação dos parasitos, os animais foram avaliados diariamente por meio da pesquisa microscópica de esfregaço sanguíneo (SILVA et al., 2006). Os dados foram analisados estatisticamente por

meio da análise de variância (ANOVA), para comparação entre as médias de período pré-patente, longevidade e parasitemia, seguida por aplicação do teste de Tukey, na significância de 5%, a fim de verificar a precisão dos dados (SILVA & AZEVEDO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolado LPV-2005 de *T. evansi* apresentou elevada patogenicidade com 100% de mortalidade dos ratos. Em outro trabalho realizado no Brasil (QUEIROZ et al., 2000), também foi avaliada a evolução da parasitemia de 10 isolados de *T. evansi* obtidos de cães, quatis e cavalos infectados naturalmente no Pantanal Mato-grossense. Estes se mostraram extremamente patogênicos para ratos Wistar, quando inoculados experimentalmente (100% de mortalidade), assim como neste estudo.

Os animais dos grupos A, B e C apresentaram um período pré-patente inferior aos do grupo D ($P < 0,05$) (Tabela 1). Acredita-se que essa diferença esteja relacionada ao processo de criopreservação, que retarda o início da multiplicação do flagelado, devido à mudança de ambiente ou hospedeiro (SILVA et al., 2003; SILVA et al., 2007). Em estudos anteriores, pesquisadores reportaram que o período pré-patente para a infecção por *T. evansi*, em ratos infectados pela via intraperitoneal, pode variar entre 1,5 e 5,6 dias (OLIVEIRA et al., 1989; QUEIROZ et al., 2001; DOYLE et al., 2007), dependendo da dose infectante, diferentemente de QUEIROZ et al. (2000), os quais não verificaram essa correlação referente à concentração de flagelado inoculada. Além disso, CARMONA et al. (2006) relataram um período pré-patente de seis dias independentemente da cepa utilizada.

Em estudos realizados pelo Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pantanal, foram encontradas variações na infectividade das cepas de

T. evansi. Estas foram pouco patogênicas em animais de laboratório quando recém-isoladas do hospedeiro natural, apresentando um período pré-patente de 12 a 43 dias e baixa parasitemia. Após algumas passagens, elas se mostraram mais infectivas com um período pré-patente de dois a quatro dias e uma parasitemia mais alta (SILVA et al., 2003). Isso explica a diferença entre o período pré-patente e a longevidade dos roedores infectados com sangue *in natura* e criopreservado, mostrando que a segunda forma de conservação do parasito retarda a infecção, além de aumentar a longevidade dos roedores. É importante ressaltar que o isolado utilizado é mantido, tanto por passagens sucessivas em ratos, quanto em nitrogênio líquido por três anos.

Foi verificada diferença estatística significativa ($P < 0,05$) em relação à longevidade dos animais de cada grupo. O sangue criopreservado proporcionou um período de vida de 27,8 dias, enquanto que a mesma dose de parasito administrada em sangue *in natura* acarretou uma longevidade inferior aos animais (4,8 dias) (Tabela 1). Pesquisadores observaram variações biométricas de tripanossomas nas passagens, em animais de laboratório. Essas alterações morfométricas durante as passagens seriam uma provável consequência da adaptação ao novo hospedeiro ou da seleção de algumas subpopulações (SILVA et al., 2003), consequentemente esta pode ter sido a causa do menor período de sobrevivência dos ratos do grupo C. Os grupos controle negativo (E e F) não apresentaram parasitemia, sendo sedados e sacrificados após 50 dias de experimento (Tabela 1).

Não foi observada diferença no tempo de sobrevivência dos ratos dos grupos A e B, o que não confirmou as suspeitas que os ratos do grupo A, por serem progênie de mães infectadas, responderiam diferentemente à infecção pelo *T. evansi* devido à transmissão passiva de anticorpos ou imunoglobulinas

Tabela 1 - Média e desvio padrão do período pré-patente, da longevidade e da parasitemia final de ratos parasitados pelo isolado LPV-2005 de *T. evansi*.

Grupo	Dose infectante (tripomastigotas/rato)	Período pré-patente (dias)	Longevidade (dias)	Parasitemia final (parasito/lâmina)
A*	10 ⁵	1,5 ^b (±0,5)	10,0 ^b (±3,4)	156,7 ^a (±25,8)
B*	10 ⁵	1,0 ^b (±0,0)	15,5 ^b (±4,9)	167,2 ^a (±29,3)
C*	10 ⁶	1,0 ^b (±0,0)	4,8 ^c (±0,7)	145,0 ^a (±28,9)
D**	10 ⁶	4,0 ^a (±0,6)	27,8 ^a (±8,8)	142,5 ^a (±33,0)
E	-	-	50,0 ^d (±0,0)	-
F	-	-	50,0 ^d (±0,0)	-

Obs: As médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferiram estatisticamente entre si a 5% de probabilidade do teste de TUKEY. Tripomastigotas de *T. evansi* em sangue: **in natura*, ** criopreservado.

pela placenta ou leite. Tal hipótese foi baseada nas conclusões de RODRIGUES et al. (2005), os quais relacionaram a severidade do surto em equinos, no Estado do Rio Grande do Sul, ao primeiro contato com o parasito. Porém, GILL (1971) verificou redução de 40% na mortalidade de ratos infectados com *T. evansi* quando receberam proteção passiva, sendo os anticorpos detectados na circulação por períodos variados.

Neste estudo, buscou-se avaliar a patogenicidade e a evolução da parasitemia frente a diferentes doses infectantes e formas de armazenamento do isolado LPV-2005, a fim de traçar delineamentos experimentais adequados para os objetivos e as hipóteses de novas pesquisas envolvendo esse protozoário. Observou-se que uma dose de 10^6 tripomastigotas em sangue *in natura* proporcionou uma infecção superaguda, com longevidade de 4,8 dias, em comparação com a inoculação de 10^5 parasitas ou sangue criopreservado, situações em que foi verificada em infecção aguda. Esses resultados corroboram outras pesquisas envolvendo o *T. evansi* (QUEIROZ et al., 2000; DOYLE et al., 2007; WOLKMER et al., 2007).

A parasitemia final dos grupos não se alterou, sendo superior a 100 tripomastigotas por lâmina em aumento de 1000 vezes. Esse valor corresponde, em média, a 10^9 flagelados por mililitro de sangue. Dados semelhantes foram verificados por QUEIROZ et al. (2000), quando compararam a patogenicidade dos isolados de *T. evansi* oriundos do Pantanal. Em cães e cavalos, o parasito não é encontrado nesse número na corrente sanguínea, no entanto causa elevada mortalidade nesses hospedeiros (COLPO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005).

CONCLUSÃO

Com base nos resultados, conclui-se que o isolado LPV-2005 apresenta elevada patogenicidade em ratos Wistar infectados experimentalmente. Os níveis de anticorpos maternos antitripanossomas não são capazes de controlar ou prolongar a longevidade de ratos filhos infectados por *T. evansi*. A dose infectante tem influência na evolução de parasitemia e longevidade dos roedores. A utilização de inóculo criopreservado de *T. evansi* eleva a sobrevivência de ratos.

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL

O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o nº 23081.012531/2008-53, e está de acordo com a legislação vigente e os Princípios Éticos publicados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

REFERÊNCIAS

- ASSOKU, R.K. Immunological studies of the mechanism of anaemia in experimental *Trypanosoma evansi* infection in rats. *International Journal for Parasitology*, v.5, n.2, p.137-145, 1975.
- CARMONA, T.M.P. et al. Susceptibility of different mouse strains to experimental infection with a Venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*. *Journal of Protozoology Research*, v.16, p.1-8, 2006.
- CARREIRA, J.C. **Sanguessugas podem transmitir o mal das cadeiras, doença de equinos que tem grande importância econômica no Brasil**. Capturado em 15 dez de 2005. On line. Disponível na Internet: http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/abr05/sanguessuga_adr.htm.
- COLPO, C.B. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cão no Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, v.35, n.3, p.717-719, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782005000300038&script=sci_arttext>. Acesso em: 20 mar. 2009. Doi: 10.1590/S0103-84782005000300038.
- DOYLE, R.L. et al. Eficácia de medicamentos no controle de infecção experimental por *Trypanosoma evansi*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, n.1, p.67-71, 2007.
- GILL, B.S. Study of passive immunity in *Trypanosoma evansi* infection. *Annales de Parasitologie*, v.46, n.3, p.225-231, 1971.
- JOSHI, P.P. et al. Human Trypanosomosis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.73, n.3, p.491-495, 2005.
- KUBIAK, G.V.L.; MOLFI, A. **Tripanosomíase equina (Mal das Cadeiras)**. Curitiba: Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná. Tip. João Haupt, 1954. 51p. (Boletim n.33).
- HERRERA, H.M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.125, p.263-275, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TD7-4D99K9P-6-7&_cdi=5191&_user=687358&_orig=search&_coverDate=11%2F10%2F2004&_sk=998749996&view=c&wchp=dGLzVtbzSkzS&md5=8cac21a0a2a9231900c55ac61a747b08&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2009. Doi:10.1016/j.vetpar.2004.07.013.
- HOARE, C.A. **The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph**. Oxford: Blackwell, 1972. 749p.
- OLIVEIRA, T.C.G. et al. Comportamento do *Trypanosoma evansi* (*T. equinum*) em animais de laboratório. *Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia*, v.41, n.4, p.271-277, 1989.
- OMER, O.H. et al. Study on the antioxidant status of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology*, v.145, n.1-2, p.142-145, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD7-4MJS09B-

- 1&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=01bdb8cef89ed2d9f18a369c7b275299>. Acesso em: 20 mar. 2009. Doi:10.1016/j.vetpar.2006.11.007.
- QUEIROZ, A.O. et al. Biological and biochemical characterization of isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso — Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.92, p.107–118, 2000. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/els/03044017/2000/00000092/00000002/art00286;jsessionid=1ndr5xm8x6dk7.alexandra?format=print>>. Doi: 10.1016/S0304-4017(00)00286-7.
- QUEIROZ, A.O. et al. Specific antibody levels and antigenic recognition of wistar rats inoculated with distinct isolates of *Trypanosoma evansi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.7, p.965-967, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762001000700014&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 20 mar. 2009. Doi: 10.1590/S0074-02762001000700014.
- RODRIGUES, A. et al. Outbreaks of Trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.239-249, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2005000400010&script=sci_arttext>. Acesso em: 20 mar. 2009. Doi: 10.1590/S0100-736X2005000400010.
- SILVA, F.A.Z.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.1, p.71-78, 2002.
- SILVA, R.A.M.S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: **biologia, diagnóstico e controle**. Corumbá: Embrapa Pantanal. 2002. 141p.
- SILVA, R.A.M.S. et al. **Metodologia da criopreservação dos *Trypanosomas evansi* e *Trypanosoma vivax***. Corumbá: Embrapa Pantanal. 2003. 3p.
- SILVA, A.S. et al. Método de contenção e confecção de esfregaço sanguíneo para pesquisa de hemoparasitas em ratos e camundongos. **Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.13, n.2, p.153-157, 2006.
- SILVA, A.S. et al. Infecção oral por *Trypanosoma evansi* em animais de laboratório. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.897-900, 2007. Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/331/33137349.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2009. Doi: 10.1590/S0103-84782007000300049.
- WOLKMER, P. et al. Resposta eritropoética de ratos em diferentes graus de parasitemia por *Trypanosoma evansi*. **Ciência Rural**, v.37, p.1682-1687, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782007000600027>. Acesso em: 20 mar. 2009. Doi: 10.1590/S0103-84782007000600027.