



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria

Brasil

Franco Sousa, Valéria Régia; Bom Parto Ferreira de Almeida, Arleana do; Antunes Barros, Luciano;
Gouveia Sales, Kátia; Silva Justino, Christiano Henrique da; Dalcin, Luciana; Bergamo do Bomfim,
Teresa Cristina

Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose

Ciência Rural, vol. 40, núm. 6, junio, 2010, pp. 1309-1313

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33117724006>

- 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

Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose

Clinical and molecular evaluation of dogs with ehrlichiosis

Valéria Régia Franco Sousa^{I*} Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida^I
Luciano Antunes Barros^I Kátia Gouveia Sales^{II} Christiano Henrique da Silva Justino^{II}
Luciana Dalcin^{II} Teresa Cristina Bergamo do Bomfim^{III}

RESUMO

A erliquiose monocítica canina é uma doença cosmopolita causada por *Ehrlichia canis* e transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, sendo frequentemente diagnosticada em cães em todo o Brasil. Este trabalho teve por objetivo investigar citológica e molecularmente a infecção por *Ehrlichia* em 195 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, analisando os achados clínicos e laboratoriais. Nos 48 cães atendidos com citologia positiva para *Ehrlichia* sp., foi possível verificar a diversidade de sinais, com predominância estatisticamente significativa de palidez de mucosas ($P\leq 0,05$), assim como variados achados hematológicos, ocorrendo tanto anemia, leucopenia e trombocitopenia, quanto normalidade ou aumento dessas células. Ocorreu aumento das proteínas plasmáticas, com hiperglobulinemia, sem, no entanto, haver diferença significativa ($P\geq 0,05$), apesar de esse achado ser frequente nessa afecção. Por meio do PCR nested, confirmou-se a infecção por *E. canis* em cães da cidade de Cuiabá.

Palavras-chave: *Ehrlichia* sp., cães, citologia, PCR-nested.

ABSTRACT

The canine monocytic ehrlichiosis is a cosmopolitan disease, caused by *Ehrlichia canis*, transmitted by ticks *Rhipicephalus sanguineus* that has been frequently diagnosed in dogs throughout the country. This study aimed to investigate the cytological and molecular *Ehrlichia* infection in 195 dogs examined at the University Veterinary Hospital of Mato Grosso, by analyzing the clinical and laboratory findings. In 48 dogs with positive cytology for *Ehrlichia* sp it was possible to detect the diversity of signs, with predominance statistically

significant of pallor of mucous membranes ($P\leq 0,05$) as well as several hematological findings, occurring anemia, leukopenia and thrombocytopenia, or increased as normal cells. There was increased of plasma proteins, with hyperglobulinemia, however without any significant difference ($P\geq 0,05$), although this finding is common in that infection. Through the nested PCR technique it was possible to confirm the infection by *E. canis* in the city of Cuiabá.

Key words: *Ehrlichia* sp., dog, citology, nested PCR.

INTRODUÇÃO

Diversas doenças transmitidas por carrapato têm assumido importância tanto em saúde pública, quanto animal. Entre estas, a erliquiose monocítica canina, causada pela *Ehrlichia canis* e transmitida por *Rhipicephalus sanguineus*, tem sido descrita no Brasil desde 1973 por COSTA et al., mas atualmente a erliquiose encontra-se disseminada em vários Estados brasileiros (MACEDO & LEAL, 2005).

Depois de um período de incubação de oito a 20 dias, o cão infectado com *E. canis* começa a apresentar diversos sinais sistêmicos, iniciando a fase aguda, quando se multiplica dentro das células mononucleares circulantes e do fígado, do baço e dos linfonodos, induzindo linfoadenomegalia e hiperplasia linforreticular (BREITSCHWERDT, 2004).

^IPrograma de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Bairro Boa Esperança, 78060-900, Cuiabá, MG, Brasil. E-mail: regia@ufmt.br. *Autor para correspondência.

^{II}Médicos Veterinários Autônomos, Cuiabá, MT, Brasil.

^{III}Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Os sinais incluem depressão, letargia, anorexia, pirexia, linfoadenomegalia, esplenomegalia e perda de peso. Os cães podem apresentar tendências a sangramento, principalmente petéquias e equimoses na pele e nas membranas mucosas, e epistaxe ocasional. Os sinais oculares não são incomuns e incluem uveíte anterior e opacidade corneana (WANER & HARRUS, 2000).

A fase subclínica da infecção ocorre após seis a nove semanas da inoculação, mas pode durar meses ou ano. É caracterizada por persistência variável de trombocitopenia, leucopenia e anemia na ausência de sinais clínicos (VARELA, 2003; BREITSCHWERDT, 2004). Os sinais clínicos da fase crônica da erliquiose são discretos e ausentes em alguns cães e graves em outros, sendo diagnosticada por ocasião da pesquisa de outras doenças.

O diagnóstico presuntivo é firmado com base nos sinais clínicos e achados laboratoriais (VARELA, 2003), porém a confirmação se dá pela visualização de mórulas em exame de esfregaço sanguíneo nos monócitos circulantes, detecção de altos títulos de anticorpos para *E. canis* ou ainda pela demonstração do DNA de *E. canis* pela PCR (WANER & HARRUS, 2000).

A amplificação do DNA de *Ehrlichia* sp. a partir de amostras clínicas é importante para a detecção e diferenciação das espécies de *Ehrlichia* porque esses organismos crescem lentamente e em limitadas linhagens celulares e, ainda, há vários níveis de reação cruzada limitando a diferenciação sorológica de várias espécies. A PCR possui a vantagem de detectar o DNA erliquial nos primeiros dias pós-infecção e é bastante específica, desde que usados oligonucleotídeos que amplifiquem o DNA da espécie investigada (SUMMER et al., 1997).

A PCR *nested* é muito sensível e específica para a detecção de *E. canis*, sendo útil para o diagnóstico laboratorial e para verificação da eficácia *in vivo* de antibióticos contra essa infecção (WEN et al., 1997).

A observação clínica de muitos cães do Município de Cuiabá, Estado do Mato Grosso, que apresentavam erliquiose com severidade variável direcionou o desenvolvimento de pesquisa clínico-laboratorial da infecção por *E. canis* em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Mato Grosso, por meio de citologia sanguínea e PCR *nested*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

No presente estudo, foram pesquisados 195 cães de diferentes raças, ambos os sexos e de diferentes faixas etárias, oriundos do atendimento clínico no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Mato Grosso, no período de maio de 2004 a julho de 2005, com sinais clínicos sugestivos de erliquiose monocítica canina ou contactantes de cães com a referida doença.

Análises clínicas

Após detalhado exame clínico dos cães, procedeu-se à coleta de amostra sanguínea, para a realização de hemograma completo, esfregaço sanguíneo do concentrado leucocitário e PCR. No hemograma, foram avaliadas as séries eritrocitárias, leucocitárias e plaquetárias de acordo com KANEKO (1997).

Para avaliação bioquímica, as amostras sanguíneas foram coletadas em tubos sem anticoagulante, e a determinação dos valores séricos de ureia, creatinina, aspartato amino transferase, alanina amino transferase, fosfatase alcalina e albumina foi realizada com *kits* comerciais (Labtest®), enquanto que a concentração sérica de globulina foi determinada por meio de cálculos aritméticos. Os níveis plasmáticos de proteína total foram determinados por refratometria (KANEKO, 1997).

Reação em Cadeia de Polimerase

A PCR foi realizada de apenas 60 amostras selecionadas de forma aleatória dos 195 cães, em razão da limitação de recursos financeiros. O DNA foi extraído a partir de alíquotas de 200µL de sangue total, utilizando-se o *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen®), conforme instruções do fabricante.

Os oligonucleotídeos utilizados para a primeira etapa de amplificação para o gênero *Ehrlichia*, baseados em sequências parciais do gene 16S rRNA, foram ECC (5'-AGAACG AACGCTGGCGCAAGCC-3') e ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3'), e no PCR *nested* para amplificação da espécie *E. canis* foram ECAN (5'-CAAITATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3') e HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTCCCTAT-3'), que amplificam fragmentos de 458 e 398 pares de bases, respectivamente (WEN et al., 1997; MURPHY et al., 1998).

A primeira etapa de amplificação (PCR) para o gênero *Ehrlichia* foi realizada utilizando-se uma reação de volume total de 50µL, com uma mistura contendo 10µL de DNA-amostra (~ 1µg de DNA); 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP

e dTTP) (Invitrogen[®]), 1,5mM de Cloreto de Magnésio (Invitrogen[®]), 20pmol de cada oligonucleotídeo (Invitrogen[®]), 1,25U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen[®]), Tampão de PCR 10X (Invitrogen[®]) e água ultra-pura qsp. A sequência térmica e de tempo consistiu de 94°C por três minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por um minuto, 65°C por dois minutos e 72°C por dois minutos e uma extensão final de 72°C por cinco minutos.

A PCR *Nested* para a espécie *E. canis* foi realizada com as mesmas condições da PCR, exceto que o DNA-amostra foi de 1,0µL do produto amplificado da PCR. A sequência térmica e de tempo consistiu de dois ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por dois minutos, e 72°C por 90 segundos, seguidos por 37 ciclos de 92°C por um minuto, 55°C por dois minutos e 72°C por 90 segundos, e uma extensão final de 72°C por cinco minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo.

Para a análise estatística dos resultados obtidos, foram utilizados o teste do Qui-Quadrado e Teste Exato de Fischer, por meio do programa Epi info versão 3.3.2., tendo sido considerados significativos os resultados com significância $P \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No exame de esfregaço sanguíneo, em 48 cães, foram observadas mórulas de *E. canis* em leucócitos, e em 147 amostras não foram encontradas tais estruturas. Dos cães com infecção, 18 eram machos e 29 fêmeas, e 18 tinham menos de um ano de idade, 15 entre um a quatro anos, nove entre quatro a oito anos e seis tinham idade superior a oito anos, não se observando diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$) entre as faixas etárias e o gênero dos cães quanto à infecção por *E. canis*, concordando com as observações de HARRUS et al. (1997). Entretanto, BANETH et al. (1996) descreve maior prevalência em cães adultos e idosos, associando ao fato de maior tempo de exposição destes ao hospedeiro invertebrado e maior suscetibilidade para os cães idosos.

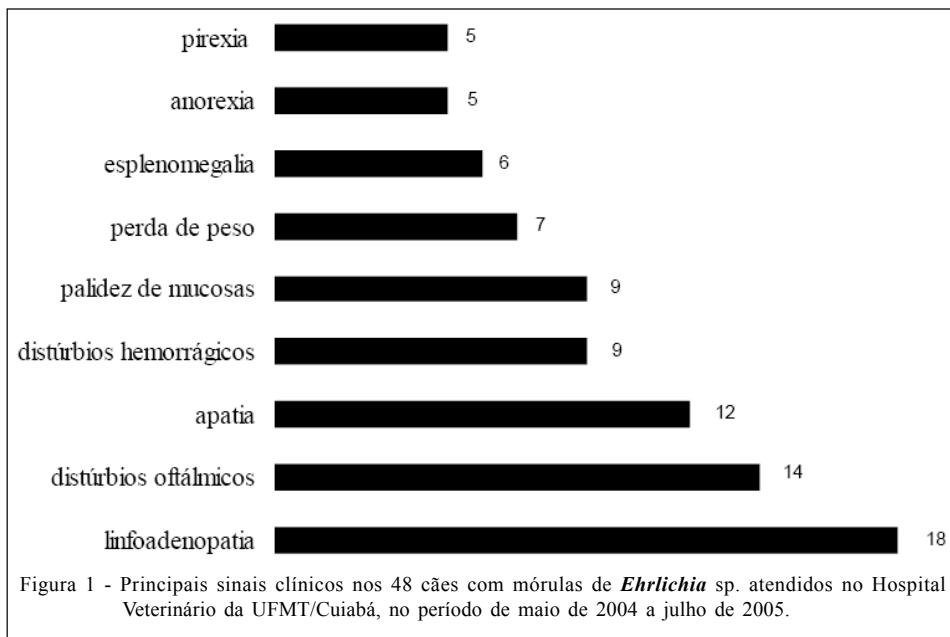
Quanto aos aspectos demográficos dos cães positivos para erliquiose canina, 43 eram provenientes de domicílios na zona urbana, dois residiam em apartamento, dois viviam na zona rural e um frequentava esporadicamente a zona rural. Trinta e dois cães apresentavam infestação por carrapato no momento da consulta veterinária, e 11 apresentaram essa infestação anteriormente. Mesmo não significativo estatisticamente, o contato de cães com o vetor *R. sanguineus* é um dado importante na ocorrência da

infecção, apesar de cinco cães dos infectados terem sido relatados como ausentes de infestação pelo vetor (atual ou anterior).

Os cães encontrados parasitados por *E. canis* foram de diferentes raças, sendo o maior número representado pelos cães sem definição racial e os da raça Pit Bull, com 10 integrantes cada, seguidos das raças Pastor Alemão (seis), Teckel (quatro), Rottweiler, Poodle, Fila Brasileiro e Cocker spaniel, com dois representantes cada um e Pequinês, Lhasa Apso, Husky Siberiano, Mastin Napolitano, Golden Retriever, Labrador, Shitzu, Boxer, Doberman e Basset hound, com um representante. Tal característica não foi estatisticamente significativa, estando de acordo com o trabalho realizado anteriormente por HARRUS et al. (1997). Segundo esses mesmos autores, os cães da raça Pastor Alemão apresentam maior gravidade clínica quando infectados, no entanto não são mais predispostos a infecção. Os seis cães dessa raça com erliquiose não apresentaram sinais clínicos severos.

Nos cães com erliquiose canina, não foram demonstradas diferenças significativas nos sinais clínicos da doença, e quatro cães não apresentaram quaisquer alterações clínicas. Os cães com infecção por *E. canis* apresentaram sinais clínicos inespecíficos, como apatia, anorexia, febre e palidez de mucosas (Figura 1), sendo este último sinal estatisticamente significativo $P \leq 0,05$. Também apresentaram distúrbios oftálmicos e tendências à hemorragia, além de esplenomegalia, concordando com os descritos por HARRUS et al. (1997) e MATTHEWMAN et al. (1993) em estudos de erliquiose canina diagnosticada por meio do teste de imunofluorescência indireta. A maioria dos achados clínicos dos cães com erliquiose não induziram grave comprometimento sistêmico, como falência renal, hepática e distúrbios hemorrágicos. De forma semelhante, ALMOSNY (1998) e TORRES (2002), em cães sem raça definida, descreveram sinais clínicos brandos (Figura 1) em cães infectados experimentalmente.

Na avaliação hematológica dos cães com erliquiose canina, não foi observada diferença significativa, sendo encontrados 20 cães com anemia (Tabela 1), e em 11 havia sinais de regeneração medular, fato também observado na análise leucocitária, sendo dados similares aos encontrados por MACEDO & LEAL (2005). De acordo com HARRUS et al. (1997) e BULLA et al. (2004), tais variações no eritrograma e leucograma ocorrem de acordo com a fase da doença. A infecção por *E. canis* pode levar à supressão difusa da medula óssea, induzindo trombocitopenia, anemia e leucopenia (MOORE & BENDER, 2000; GOULD et al., 2000). Dos cães infectados, 14 apresentaram trombocitopenia (Tabela 1), não sendo verificada



diferença significativa com os cães negativos. Essas observações demonstram que a trombocitopenia é um achado característico, mas não exclusivo de erliquiose canina, podendo aparecer em diversos quadros nosológicos.

Na análise da concentração proteica dos cães com erliquiose canina, observou-se um aumento de globulina em 20 cães. Segundo GOULD et al. (2000), isso ocorre por aumento da fração gama, muitas vezes monoclonal, induzindo hiperviscosidade sérica e exacerbação hemorrágica por interferência física com as plaquetas e fatores da coagulação, além de causar danos ao endotélio vascular e venoestase, enquanto a hipoglobulinemia e a hipoalbuminemia foram detectadas em 23 e 21 cães infectados, respectivamente. Tal fato pode ser justificado pela presença de distúrbios entéricos ou hepáticos graves, levando tanto à perda de albumina, como de globulina intestinal. A hipoalbuminemia também pode estar associada ao sequestro ou edema advindo da vasculite na fase aguda; e na fase crônica, da perda glomerular decorrente da deposição de imunocomplexos ou imunoestimulação crônica.

Avaliando o perfil renal e hepático dos cães diagnosticados com *E. canis*, observou-se um aumento de ureia e creatinina em cinco e quatro cães respectivamente (dados não estatisticamente significativos). Essa elevação sérica de ureia e creatinina podem estar relacionadas à azotemia pré-renal, principalmente nos animais com desidratação severa ou ainda a glomerulonefrite nos casos crônicos de

erliquiose. Os níveis séricos da fosfatase alcalina, da alanina aminotransferase e do aspartato aminotransferase encontraram-se elevados em pequeno número de amostras (seis cada um), fato que pode decorrer de dano hepático ou de estresse sistêmico provocado por diversas doenças, inclusive pela erliquiose (ALMOSNY, 1998).

Dos sessenta cães testados pela PCR e PCR *nested*, em três detectou-se DNA de *Ehrlichia* sp., em nove de *E. canis*, e em outras três amostras houve amplificação tanto de *Ehrlichia* sp quanto de *E. canis*. Destes, em apenas três, houve a observação de mórulas no esfregaço sanguíneo. A PCR *nested*, quando comparada à PCR, demonstrou sensibilidade e especificidade de 50 e 83%, respectivamente. Para WEN et al. (1997), a PCR *nested* é altamente sensível e específica para a detecção de *E. canis*, sendo um teste muito eficaz no diagnóstico. Em nove amostras em que não foi constatada a amplificação de DNA, foram observadas mórulas, que, para MYLONAKIS et al. (2003), podem ser outras inclusões intracitoplasmáticas em leucócitos, incluindo grânulos azurófilos e material proveniente de fagocitose, fato gerador de falsos-positivos, diminuindo a especificidade da citologia.

CONCLUSÃO

O estudo realizado permitiu concluir que as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas observadas nos cães com infecção por *E. canis* são bastante inespecíficas, assim como não há

Tabela 1 - Principais alterações hematológicas nos 48 cães com mórulas de *Ehrlichia* sp. atendidos no Hospital Veterinário da UFMT/Cuiabá, no período de maio de 2004 a julho de 2005.

Alterações hematológicas	Nº Cães	Percentual (%)	χ^2	p
Anemia	20	41,67	0,00	0,98
Leucocitose	6	12,50	0,04	0,83
Leucopenia	6	12,50	0,17	0,68
Neutrofilia	9	18,75	0,8	0,37
Neutropenia	2	4,17	0,1	0,39
Linfocitose	2	4,17	0,1	0,39
Linfopenia	3	6,25	0,8	0,37
Trombocitose	7	14,58	0,34	0,55
Trombocitopenia	14	29,17	0,01	0,93

χ^2 - Valor de Qui-quadrado.

P - significativo em nível de 5% de probabilidade estatística.

predisposição etária, sexual ou racial. Este trabalho também permitiu a caracterização molecular da infecção em cães domiciliados em Cuiabá.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso, pelo apoio financeiro, e à professora Dra. Rosângela Zacarias Machado, pelo apoio nas provas moleculares.

REFERÊNCIAS

- ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis* (DONATIEN e LESTOQUARD, 1935): avaliação parasitológica, hematológica, bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. 1998. 115f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.
- BANETH, G. et al. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. *Veterinary Record*, v.138, n.11, p.257-259, 1996.
- BREITSCHWERDT, E.B. Rickettsioses. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de medicina interna veterinária. Doenças do cão e do gato*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.422-429.
- BULLA, C. et al. Fase aguda da erliquiose monocítica canina: um estudo retrospectivo de 10 anos. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, v.2, p.82-85, 2004.
- COSTA, J.O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Arquivo da Escola de Veterinária*, v.25, p.199-200, 1973.
- GOULD, D.J. et al. Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. *Journal Small Animal Practice*, v.41, n.6, p.263-265, 2000.
- HARRUS, S. et al. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Veterinary Record*, v.141, n.14, p.360-363, 1997.
- KANEKO, J.J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego: Academic, 1997. 932p.
- MACEDO, A.B.; LEAL, E.R.V. Ehrlichiose canina: estudo retrospectivo e principais achados hematológicos. *Revista Nossa Clínico*, n.45, p.30-34, 2005.
- MATTHEWMAN, L. A. et al. Infections with *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in dogs in Zimbabwe. *Veterinary Record*, v.133, n.14, p.344-346, 1993.
- MOORE, F.M.; BENDER, H.S. Neutropenia. In: FELDMAN, B.F. et al. *Schalm's veterinary hematology*. 5.ed. Canadá: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.350-355.
- MURPHY, G.L. et al. Molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Veterinary Parasitology*, v.79, n.4, p.325-339, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD7-3V51CF7-6&_user=686451&_coverDate=11%2F27%2F1998&_rdo=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C0000037559&_version=1&_urlVersion=0&_userid=686451&md5=a7f97207d0013342ea60a1b8437ead0c>. Acesso em: 23 maio, 2008. doi:10.1016/S0304-4017(98)00179-4.
- MYLONAKIS, M.E. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*, v.91, n.2-3, p.197-204, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD6-471VYX4-5&_user=686451&_coverDate=02%2F02%2F2003&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=132556899&_rerunOrigin=google&_acct=C000037559&_version=1&_urlVersion=0&_userid=686451&md5=991b2819b3a6ca4cb86487866169065b>. Acesso em: 23 maio, 2008. doi:10.1016/S0378-1135(02)00298-5.
- SUMMER, J.W. et al. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of *Ehrlichia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.8, p.2087-2092, 1997. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/reprint/35/8/2087.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2007.
- TORRES, H.M. Isolamento e propagação de *Ehrlichia canis* (Donati & Lestoquard, 1935) em células DH82 e obtenção de antígeno para a reação de imunofluorescência indireta. 2002. 63f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias – Sanidade Animal) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.
- VARELA, A.S. Tick-borne *Ehrlichiae* and *Rickettsiae* of dogs. In: BOWMAN, D.D. *Companion and exotic animal parasitology*. 2003. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 6 abr. 2004.
- WANER, T.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis (CME). In: *Recent advances in canine infectious disease*. 2000. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 08 jan. 2005.
- WEN, B. et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in the dogs treated with doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.7, p.1852-1855, 1997. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/35/7/1852>. Acesso em: 25 jun. 2007.