



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E DA SAÚDE –
FACES**

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**JOÃO CARLOS MORAIS E SILVA
RAFAEL DE JESUS MOREIRA**

**Pesquisa de Rickettsia, Erlichia e Anaplasma em
ectoparasitas coletados em cães no Distrito Federal, no
ano de 2015**

BRASÍLIA-DF

2016



JOÃO CARLOS MORAIS E SIVA
RAFAEL DE JESUS MOREIRRA

**Pesquisa de Rickettsia, Erlichia e Anaplasma em
ectoparasitas coletados em cães no Distrito Federal, no
ano de 2015**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa pela Faculdade de Ciências da Educação e da Saúde – FACES.

Orientação: Bruno Silva Milagres.

BRASÍLIA-DF
2016

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer a todos aqueles amigos e familiares que torcerem para que esse projeto desse certo.

Gostaria de agradecer ao meu grande mestre, o orientador Bruno Silva Milagres que com sua ajuda, sabedoria, dedicação e paciência foi de extrema importância, proporcionando a devida orientação para a pesquisa. Ao parceiro de pesquisa Rafael de Jesus Moura, que contribuiu diretamente para a concretização da pesquisa com sua ajuda e dedicação.

Um agradecimento ao CNPq pelo intuito de acreditar em novos pesquisadores, dando, assim, todo auxílio e suporte para que o projeto existisse e ao Centro Universitário de Brasília, UniCEUB, pelo grande apoio, compreensão e dedicação aos jovens pesquisadores que precisavam sanar dúvidas e questionamentos.

No mais, agradecer a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para que a pesquisa fosse iniciada e finalizada com êxito. À todos vocês meu eterno agradecimento.

“A ciência trabalha no limite entre conhecimento e ignorância. Não temos medo de admitir o que não sabemos, não há vergonha nisso. A única vergonha seria fingir que sabemos de tudo.” (Neil deGrasse Tyson)

RESUMO

Carrapatos são ectoparasitas obrigatórios onde 10% das espécies infectam o homem e outros mamíferos por agentes etimológicos, bactérias, vírus ou protozoários, causadores de doenças hematoparasitoses, tais como: *Rickettsia*, que se caracteriza por infecções por bactérias gran-negativas, do grupo da Febre Maculosa; erliquiose, que é causada pela espécie *Ehrlichia canis*, uma bactéria pertencente à família *Rickettsiaceae*, de gênero *Ehrlichia*, que se configura como uma das principais infecções caninas, tendo como o principal vetor o carrapato vermelho ou marrom da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. A *Anaplasma platys* é uma espécie de bactéria do gênero *Anaplasma*, pertencente da família *Anaplasmatacea*, de ordem das *Rickettsiales*, que acomete cães que estiveram em contato com carrapato. A identificação dessas bactérias se faz através da análise da biologia molecular dos carrapatos por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), para que se chegue a um diagnóstico preciso. O objetivo desta pesquisa foi determinar a presença dessas enfermidades em cães das cidades satélites do Distrito Federal (DF) no período de 2015 a 2016, além da epidemiologia descritiva dos casos de febre maculosa no Brasil. A coleta foi realizada por meio da extração de 62 ectoparasitas presentes em 10 cães previamente selecionados, em seguida foi feita a identificação dos carrapatos conforme sexo, espécie e estágio de desenvolvimento, onde foram devidamente agrupados em *pools*, de acordo com o sistema de classificação estabelecida pelos integrantes desta pesquisa. Foram realizados testes prévios de PCR utilizando baixas concentrações (20ng e 50ng) dos controles positivos para comprovar que o PCR funcionaria para amostras contendo baixas concentrações de DNA (*Ácido desoxirribonucleico*). Devido ao tamanho dos espécimes coletados, várias amostras tiveram concentrações muito baixas de DNA que prejudicaram e/ou não permitiram a realização dos PCRs, na qual foram catalogados e analisados 20 amostras dos 62 indivíduos entre machos e fêmeas com estágios de desenvolvimento variando entre ninfas, larvas e adultos com potencial concentração de material biológico, todos sendo da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. Todas as amostras analisadas tiveram resultados negativos para *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Com base em revisão

bibliográfica nos anos de 2015 foram confirmados 90 casos de febre maculosa, sendo que 62% dos casos se encontram em São Paulo (SP), tendo uma letalidade de 44.4%, com estimativa de 68,8% dos casos sendo do sexo masculino com faixa etária mais acometida entre 40 a 59 anos. A predominância dessas bactérias se dá em zonas rurais, sendo menos presentes em áreas urbanas no decorrer de 2015. Com relação ao Distrito Federal não foram relatados casos no ano de 2015, porém é de extrema importância a realização de novas pesquisas com estudos mais aprofundados, para que se possa fazer um maior levantamento de dados de coleta, além de uma maior sensibilização dos profissionais da saúde para este agravo.

Palavras-chaves: Carrapatos. Zoonoses. Epidemiologia.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	8
LISTADE IMAGENS.....	9
1. INTTODUÇÃO.....	10
2. METODOLOGIA DE PESQUISA.....	13
2.1 ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO.....	13
2.2 VETORES.....	13
2.3RESERVATÓRIO.....	14
2.4 EXTRAÇÃO DE DNA	14
2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – (PCR)	15
3. RESULTADOS	16
4. DISCUSSAO	23
5. CONCLUSÃO.....	26
6. REFERÊNCIAS.....	27

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

DF	Distrito Federal – Brasil.
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FMB	Febre Maculosa Brasileira
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação

LISTADE IMAGENS E GRÁFICOS

Quadro 1: Concentração de DNA em amostras coletadas dos carrapatos.

Figura 1: Gel de Agarose para avaliar o PCR das amostras de DNA extraídos dos carrapatos.

Figura 2: Testes do PCR utilizando baixas concentrações de DNA (20ng e 50ng).

Gráfico 1: Número de Casos de Febre Maculosa notificados e confirmados no ano de 2014 a 2015

Gráfico 2: Número de casos de Febre Maculosa no Brasil no ano de 2014 a 2015

Gráfico 3: Porcentagem média do nº de casos de Febre Maculos Por Zonas infectadas entre os anos de 2014-2015.

Gráfico 4: Porcentagem média de nº de casos de Febre Maculosa no Brasil por Gênero nos anos de 2014 a 2015.

Gráfico 5: Número de casos de Febre Maculosa no Brasil por faixa etária entre 2014 a 2015

Gráfico 6: Número de óbitos por Febre Maculosa no Brasil avaliados no ano de 2014 a 2015.

1. INTRODUÇÃO

Carrapatos são artrópodes hematófagos, ectoparasitas obrigatórios não permanentes e de extrema importância na transmissão de enfermidades zoonóticas por meio de bioagentes que podem causar complicações clínicas ao seu hospedeiro (VIEIRA et al., 2002). A distribuição dessa enfermidade é de nível mundial, sendo mais presentes em zonas urbanas e rurais, porém, devido as condições climáticas do Brasil, o desenvolvimento de infestações desses artrópodes é favorecido (SOUZA et al., 2009). Carrapatos são parasitas de diversos animais, tais como anfíbios, répteis, aves e mamíferos (LUZ et al., 2013). Porém se percebe uma maior infestação em mamíferos domésticos como bois, cavalos, cães e o homem, ficando presos à pele do animal parasitado por semanas, se alimentando de seu fluido biológico (DASTAS-TORRES, 2009), abandonando-o em seguida e parasitando outros diferentes animais ao longe de seu ciclo de vida, na qual é dessa forma que esses ectoparasitas promovem um prejuízo econômico estimado no Brasil em R\$ 2 bilhões no setor do agronegócio (GRISIS et al., 2002).

Outro problema observado está na infestação desses artrópodes em cães domésticos, onde são considerados uma das maiores preocupações à saúde do cachorro devido as graves enfermidades hematoparasitoses trazidas ao animal por agentes etiológicos como, bactérias, vírus ou protozoários provenientes da picada do carrapato, e conseqüentemente transmitida ao homem (KANTOS et al, 2014). Nos últimos anos, tem se confirmado um melhoria em volta dos estudos relacionados a doenças irradiadas por aproximadamente 10% das espécies de carrapatos no Brasil. Estudos mais recentes demonstram que as principais doenças endêmicas em certas regiões do país são as *Rickettsia*, *Ehrlichia canis*, uma bactéria pertencente à família *Rickettsiaceae*, de gênero *Ehrlichia* e *Anaplasma* (RAMOS et al, 2010;. SPOLIDORIO et al, 2011 ;. VIEIRA et al, 2013 ;. COSTA-JÚNIOR et al, 2012 ;. SILVA et al, 2012 ;. DEMONER et al, 2013).

O grupo das riquetsioses é constituído por parasitas intracelulares obrigatórios que se caracteriza por infecções de bactérias gram-negativas, do grupo da Febre Maculosa (MILAGRES et al., 2013). A Rickettsiales é uma ordem

normalmente dividida em dois grupos: O grupo tifo e o grupo das Febres Maculosas. O grupo tifo manifesta uma das mais letais infecções para o homem, com cerca de 60% de casos de óbito sem tratamento, e estando limitada a três principais espécies a *Rickettsia prowazekii*, uma bactéria intracelular obrigatório, do tipo gram-negativa que infecta e cresce no citosol das células dos seus hospedeiros; A *Rickettsia typhi* outra enfermidade causado pelo agentes etimológicos gram-negativas, causadora do tifo murino e com estágio de transmissão alternados em dois ciclos, sendo o primeiro em ratos selvagens e o segundo em animais domésticos, tais como gatos e cães; A espécie *Rickettsia canada* é uma bactéria gram-negativa que é singular de carrapatos (CHAREONVIRIYAPHAP et al, 2014;. GAZI et al, 2013;. MILAGRES et al, 2010;. NOGUERAS et al, 2013;. WOOD et al, 2012).

O grupo das febres maculosas são constituídas por inúmeras espécies de carrapatos, onde as principais endêmicas no Brasil são: *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma cajennense* que se caracteriza por um ectoparasita vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, microrganismo intracelular obrigatório, agente da febre maculosa e febre das montanhas do norte (termo usado em diagnóstico de pacientes vivos na América do Norte), que ocasiona fase febril aguda de gravidade variável, o que torna essa enfermidade de maior importância médica no Brasil (COUTO et al, 2015; MILAGRES et al, 2010).

A febre maculosa brasileira (FMB), é a febre mais mortal do mundo dentro o grupo da febre maculosa onde se tem evidenciados e divulgados 1146 casos, com cerca de 411 mortes confirmadas (40,5% de taxa de mortalidade) na região sudeste do Brasil, nos anos de 1985-2012 (KRAWCZAK et al, 2014). A identificação dessas bactérias se faz através da análise da biologia molecular dos carrapatos, e por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). Embora o sintomas da febre maculosa brasileira (FMB) sejam característicos, ela é facilmente confundida com outros tipos de febres provocadas por bactérias gram-negativas, tornando a análise laboratorial indispensável para que se chegue a um diagnóstico preciso (COSTA et al, 2015).

Como citado acima, outras patologias associadas a picada do carrapato é a *Ehrlichia* e *Anaplasma*. A Eriquiose é causada por uma bactéria gram-

negativa intracelular obrigatória que infectam animais vertebrados, onde se verifica uma maior infestação em mamíferos, tais como gatos, ovelhas, bovinos, equinos, cães e homem (ARRAIS, 2013). O gênero *Ehrlichia* pertence à família das *Rickettsiaceae* e compreende, atualmente, cinco espécies válidas: *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium*, sendo essas erliquioses causadoras de doenças distintas (AGUIAR, 2007).

A Erliquiose canina é uma bactéria intracitoplasmática e pertence à ordem Rickettsiales, proveniente de ectoparasitas, sendo seu principal vetor o *Rhipicephalus sanguineus*, vulgarmente conhecido com carrapato marrom, e que mais acomete cães domésticos. Essa doença é caracterizada pela redução dos elementos celulares sanguíneos obrigatórios dos leucócitos, provocando a doença mundialmente conhecida como Tickborne canina. Considera-se essa doença amplamente distribuída por todo Brasil, com aproximadamente 40% dos casos registrados em cães (ARRAIS, 2013;. OTRANTO et al 2008;. STANNECK et al, 2012;. NICHOLSON et al, 2010;. STANNECK & FOURIE, 2013).

A Anaplasmataceae está inserida à uma família compostas por agentes patogênicos e não-patogênicos, conhecidas como comensais e mutualísticos. A Anaplasmose é uma das hematoparasitoses promovida pelas bactérias, de caráter zoonótico, intracelulares obrigatórias que infectam neutrófilo, hemácias, células granulocíticas saudáveis e, até mesmo, hematopoiéticas de seus hospedeiros, tais como canídeos, bovinos e equídeos, podendo, também, infectar humanos através da picada do carrapato do gênero *Ixodes* (GOMES, 2008;. RIKIHISA, 2010).

O objetivo deste trabalho foi determinar a presença de *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* em ectoparasitas coletados de cães nas cidades satélites do Distrito Federal (DF) no período de 2015, além da epidemiologia descritiva, por meio de revisões bibliográficas, dos casos de febre maculosa, erliquiose e anaplasma no Brasil.

2. METODOLOGIA DE PESQUISA

2.1 ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS

Foi feita uma pesquisa descritiva em cima de revisões bibliográficas em volta das doenças acometidas em carrapatos, seus principais vetores, meios de infecção e transmissão, além dos diagnósticos clínicos sobre Febre maculosa, Erliquiose e Anaplasma que estão acometidas nos ectoparasitas estudados ao longo da pesquisa.

Se fez necessário o levantamento de casos relatados dessas doenças, afim de computar dados, por meio de pesquisas em livros, artigos e semiários, retrospectivas, que foram de extrema importância para o andamento da pesquisa.

A computação de dados se fez através dos programas de computadores Microsoft Word -2013, Microsoft Excel, e, o aplicativo para armazenamentos de dados OneDrive.

2.2 VETORES.

Na indagação do estudo dos ectoparasitas, nos baseamos em acervos bibliográficos atualizados sobre os principais vetores das enfermidades abordadas nesta pesquisa. A coleta dos ectoparasitas foi realizado por meio de busca ativa em cachorros domésticos e de vida livre, de raça pura e mestiços e em Petshop das cidades satélites do Distrito Federal (DF) como Taguatinga, Guará, Samambaia e Lago sul. Os parasitas foram acondicionados em recipiente plástico de armazenamento de material biológico de 150ml, em meio a álcool 70%, para melhor preservação das amostragens biológicas, onde foram separados por gênero, sexo, tamanho e estágio de desenvolvimento, onde foram devidamente agrupados em *pools*, de acordo com o sistema de classificação usando chave dicotômica e pictórica descrita por Aragão & Fonseca (1961), onde foram enviadas para o Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia do Departamento de Bioquímica e Biologia molecular da Universidade Federal de Viçosa para se fazerem análises da biologia molecular dos carrapatos para se averiguar a presença da bactéria *Rickettsia rickettsii*, *Erlchiose canis* ou

Anaplasma, por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), onde foram testados previamente utilizando baixas concentrações (20ng e 50ng) dos controles positivos para comprovar que o PCR funcionaria para amostras contendo baixas concentrações de *DNA (Ácido desoxirribonucleico)*. Os primers utilizados nos PCRs foram: Rickettsia - CS 239 / CS 1069; Hepatozoon - HepF / HepR; Ehrlichia - DSB330 / DSB 728.

2.3 RESERVATÓRIOS

O estudo dos reservatório e animais sentinelas das riquetisioses, erliquias e anaplasma, foram baseadas em pesquisas bibliográficas e acervos eletrônicos atualizados da literatura através de artigos, seminários e livros dentro da área de saúde pública, epidemiologia e parasitologia sobre o papel do cão na promoção do ciclo de vida dos carrapatos e na importância desse intermediário na disseminação das enfermidades presentes nessa pesquisa. Foi aplicada uma ficha cadastral para cada cachorro das cidades satélites do DF, com as seguintes observações: quantidade de carrapatos coletados em cada animal, raça, endereço, nome do cachorro e data da última aplicação de algum pesticida.

2.4 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA dos ectoparasitos foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Billings e colaboradores (1998). Cada *pool* de ectoparasitas foi lavado com etanol 70% em quantidade suficiente para cobrir os ectoparasitos durante 15 minutos. Em seguida, foram lavados em tampão fosfato (PBS pH 7,2) por 5 minutos (duas vezes). Foram adicionados 200 µL do tampão fosfato para maceração dos vetores, os quais foram triturados com auxílio de uma ponteira de polietileno. No mesmo tubo foram acrescentados SDS 10% v/v e Proteinase K (20mg/mL) para uma concentração final de 1% e, em seguida, incubados em banho-maria a 55°C *overnight*. À amostra digerida, acrescentou-se 200 µL de fenol:clorofórmio (1:1), submetendo-a a centrifugação (12000 x g, 2 minutos). A fase aquosa foi retirada e o sobrenadante transferido para um tubo novo. Esse procedimento foi repetido 6 vezes. Ao sedimento, foram adicionados

200 µL de clorofórmio, seguido de uma nova centrifugação. O sobrenadante foi novamente transferido para um tubo estéril, sendo acrescido 40 µL de NaCl 2,5M, 200 µL de clorofórmio e dois volumes de etanol 100% gelado. Os tubos foram armazenados a -20°C overnight. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g sob temperatura de 4°C por 15 minutos. Ao sedimento restante, foram adicionados 300 µL de etanol 70% e novamente centrifugados a 13000 rpm sob temperatura de 4°C por 15 minutos, para ressuspender o DNA previamente precipitado. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido em 100 µL de água estéril, destilada e deionizada e posteriormente, armazenados a -4°C. Desse material foram retirados 20 µL para quantificação em espectrofotômetro (260 nm), sendo todas as amostras ajustadas para concentração de 50 ng/µL.

2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – (PCR)

Pesquisa de DNA de *Rickettsia* spp. através da amplificação de um fragmento de 549 pares de bases do gene citrato sintase (*gltA*), detectado em todas as espécies de *Rickettsia*, utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores, denominados CS1069 (CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT) e CS239 (GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT) referente ao gene citrato sintase com um tamanho de fragmento aproximado de 549 pares de base. Para os genes de hepatozoa foram utilizados HepF (5'-ATACATGAGCAAAATCTCAAC-3') and HepR (5'-CTTATTATTCCATGCTGCAG-3') (Inokuma et al., 2002).

A PCR de ehrlichia foi realizada conforme Doyle et al. (2005), visando à amplificação de fragmento de 409 pares de base (pb) do gene *dsb* de Ehrlichia spp., utilizando-se os iniciadores Dsb-330 (5'-GAT GAT GTC TGA AGA TAT GAA ACA AAT-3') e Dsb-728 (CTG CTC GTC TAT TTT ACT TCT TAA AGT-3').

Os dados da PCR realizada são os seguintes. Mix com composição de água (10,32uL), tampão 10X com MgCl₂ (15mM) (2uL), dNTP (2mM) (4uL), primer CS239 (10uM) (0,8uL), primer CS1069 (10uM) (0,8uL), KapaTaq (U/uL) (0,1uL).

3. RESULTADOS

Depois dos métodos adotados para a classificação dos carrapatos, foi possível se obter a identificação total de 62 ectoparasitas enviados para análise, não sendo possível a identificação de 42 exemplares devido à baixa concentração de matéria biológico, no caso, de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) o que prejudicou ou impossibilitou a devida análise da biologia molecular desses exemplares por meio de PCRs. Se obteve a análise ideal de 20 espécimes do total, onde desses foi obtido: 2 ninfas fêmeas pertencentes ao grupo R2- amostra 1; 1 ninfa macho pertencente ao grupo R2- amostra 2; 2 larvas pertencentes ao grupo R2- amostra 3; 4 machos adultos pertencentes ao grupo R1- amostra 4; 1 fêmea adulta pertencente ao grupo R1- amostra 5; 2 fêmeas adultas pertencentes ao grupo R3- amostra 6; 1 macho adulto pertencente ao grupo R4- amostra 7; 2 Fêmeas adultas pertencentes ao grupo A- amostra 8; 1 ninfa fêmea pertencente ao grupo A- amostra 9; 4 ninfas fêmeas pertencentes ao grupo B- amostra 10. Todos os exemplares foram identificados como sendo da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. O quadro a seguir mostra a quantidade de material biológico dos exemplares que foram analisados.

Quadro 1: Concentração de DNA em amostras coletadas dos carrapatos.

Amostras Obtidas	Concentração de DNA
Amostra 1	29,65 ng/μL
Amostra 2	116,3 ng/μL
Amostra 3	12,95 ng/μL
Amostra 4	159,7 ng/μL
Amostra 5	57,3 ng/μL
Amostra 6	809,95 ng/μL
Amostra 7	70,2 ng/μL
Amostra 8	4,5 ng/μL
Amostra 9	19,7 ng/μL
Amostra 10	13,35 ng/μL

A coleta foi prejudicada pelo período de chuva que se instalou nos últimos meses das coletas, diminuindo assim o número de parasitas coletados, outro empecilho foi a falta de informação por parte dos donos dos animais, em relação a Febre Maculosa, onde muitos desconheciam a existência de tal enfermidade, evitando assim que realiza-se a procura pelo parasita no cachorro, pois achavam que seus animais seriam recolhidos. Outra dificuldade estava relacionada à coleta dos ectoparasitas em animais de vida livre, uma vez que esses animais não permitiram a devida aproximação e contato por parte dos integrantes da pesquisa, impossibilitando a devida coleta de carrapatos.

As análises em PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e a Eletroforese em Gel de Agarose, realizada em todos os 20 carrapatos com quantidade mínima de material biológico, tiveram resultado negativo para a bactéria *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*. A figura 1 demonstram os testes feitos para cada amostra em Gel de Agarose dos PCRs.

Figura 1: Gel de Agarose para avaliar o PCR das amostras de DNA extraídos dos carrapatos.



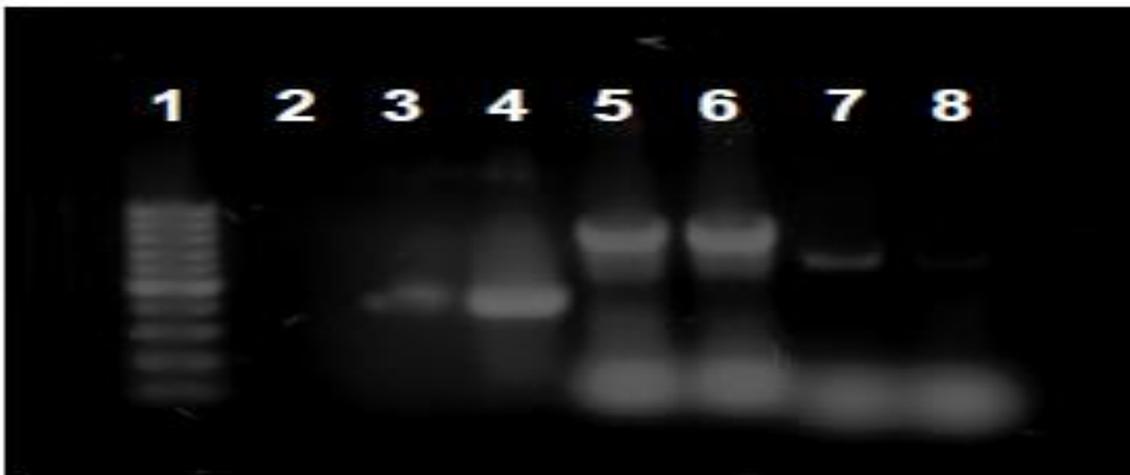
Fonte: Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade de Viçosa - MG.

- | | |
|---|--------------------------------------|
| 1- peso molecular | 11- amostra 6 para <i>Erlchia</i> |
| 2- amostra 4 para <i>Rickettsia</i> | 12- amostra 7 para <i>Erlchia</i> |
| 3- amostra 5 para <i>Rickettsia</i> | 13- vazio |
| 4- amostra 6 para <i>Rickettsia</i> | 14- amostra 4 para <i>Hepatozzon</i> |
| 5- amostra 7 para <i>Rickettsia</i> | 15- amostra 5 para <i>Hepatozzon</i> |
| 6- controle positivo para <i>Rickettsia</i> | 16- amostra 6 para <i>Hepatozzon</i> |
| 7- controle negativo para <i>Rickettsia</i> | 17- amostra 7 para <i>Hepatozzon</i> |
| 8- vazio | 18- vazio |
| 9- amostra 4 para <i>Erlchia</i> | 19- vazio |
| 10- amostra 5 para <i>Erlchia</i> | |

Fonte: Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade de Viçosa - MG.

A figura 2 esboça os testes de controle positivo realizados em PCRs nas baixas concentrações de 20ng e 50ng.

Figura 2: Testes do PCR utilizando baixas concentrações de DNA (20ng e 50ng).

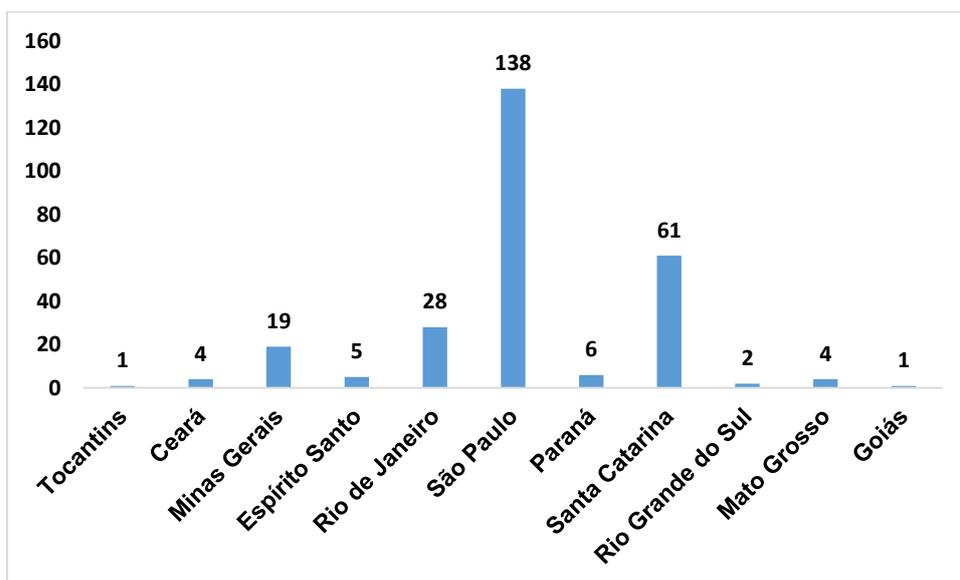


- 1- marcador molecular
- 2- controle negativo *Rickettsia*
- 3- controle positivo *Rickettsia* com 50 ng
- 4- controle positivo *Rickettsia* com 20 ng
- 5- controle positivo *Hepatozoon* com 50 ng
- 6- controle positivo *Hepatozoon* com 20 ng
- 7- controle positivo *Erlichia* com 50 ng
- 8- controle positivo *Erlichia* com 20 ng

Fonte: Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade de Viçosa - MG.

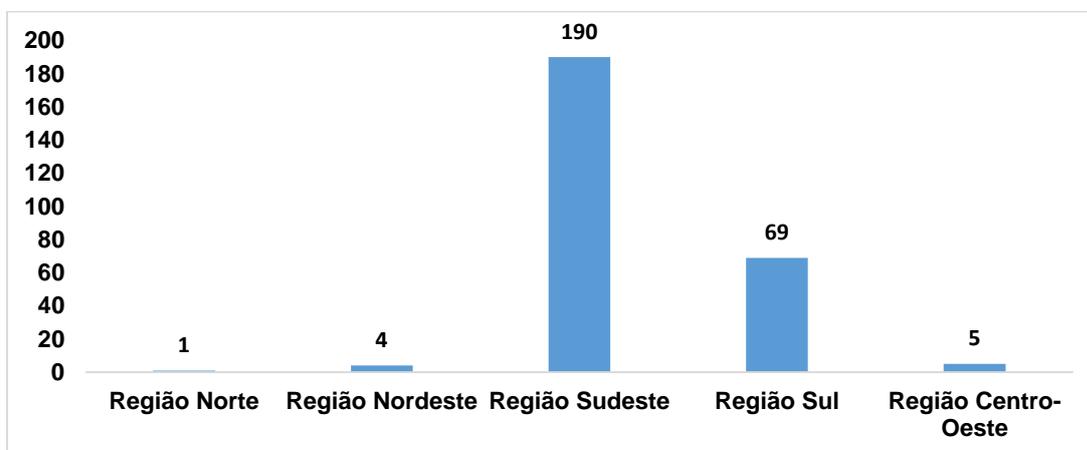
Os anos de 2014 e 2015 foram registrados um total de 269 casos de Febre Maculosa confirmados acometendo em toda região do Brasil, onde foram confirmados 138 casos só no estado de São Paulo, como mostra o gráfico 1. Pode se verificar através do gráfico 2, dados comparativos de casos notificados de febre maculos nas regiões do país, onde se percebe que a região Sudeste acomete 190 casos confirmados de uma somatória de 269.

Gráfico 1: Número de Casos de Febre Maculosa notificados e confirmados no ano de 2014 a 2015.



Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net, 2016.

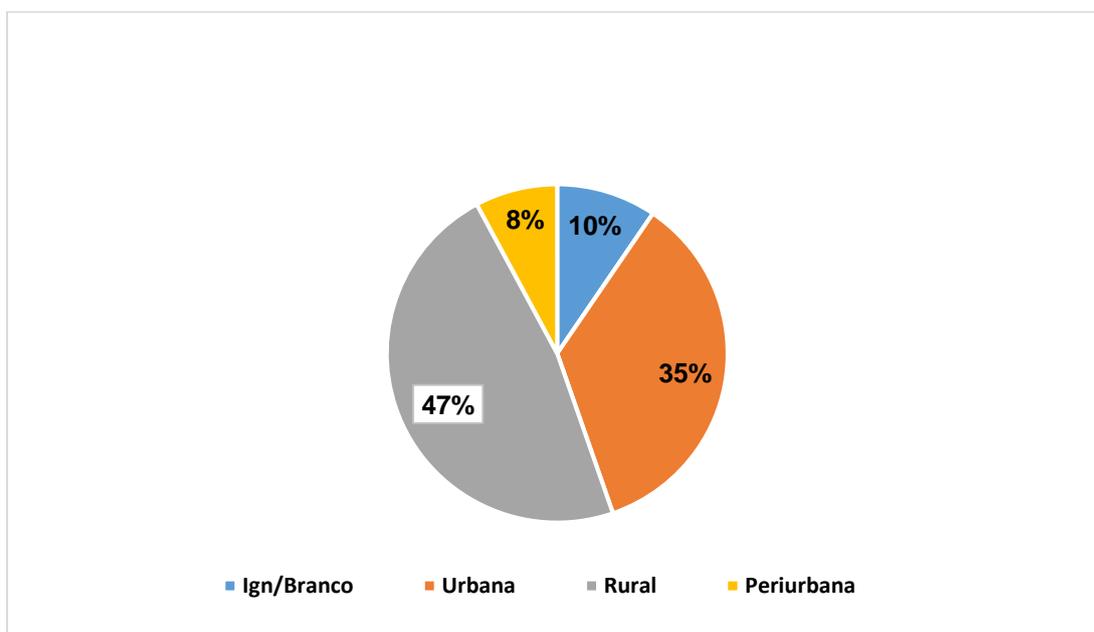
Gráfico 2: Número de casos de Febre Maculosa no Brasil no ano de 2014 a 2015



Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net, 2016.

Diante do número de casos registrados nos anos estudados de 2014 a 2015 mostrados pelos gráfico 3, observou-se uma média da prevalência maior de 47% dos casos em zona rurais devido à grande facilidade de proliferação de carrapatos nessas áreas, seguido de 35% dos casos registrados desses anos estudados em zonas urbanas, e 18% dos casos para áreas de transição entre rural e urbana

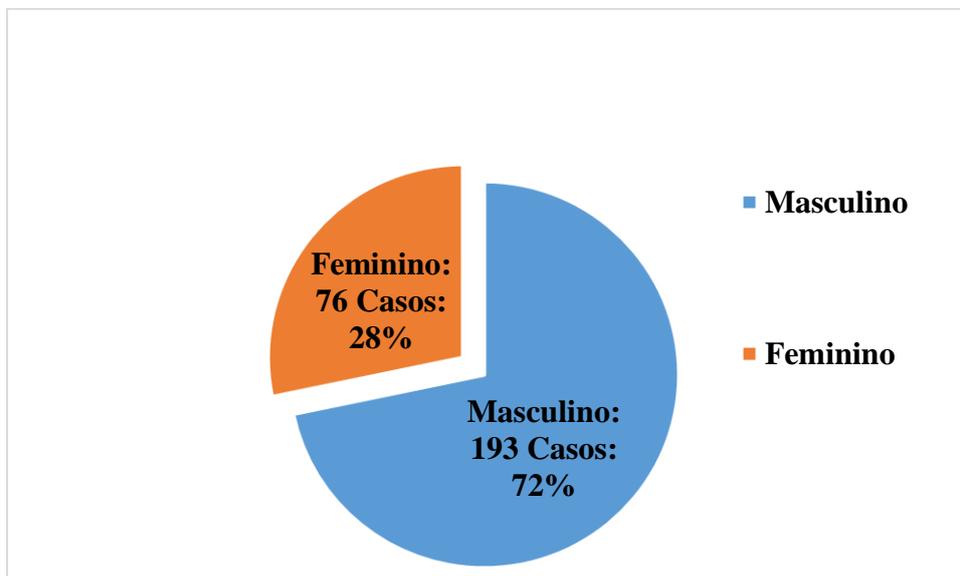
Gráfico 3: Porcentagem média do nº de casos de Febre Maculos Por Zonas infectadas entre os anos de 2014-2015.



Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net, 2016.

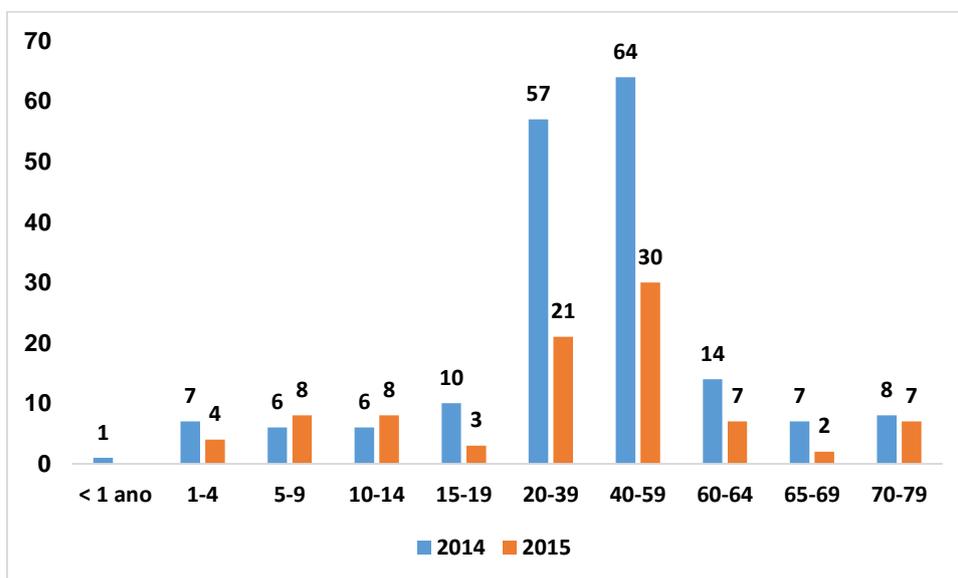
Estudos preliminares feitos nos anos de 2014 a 2015, como mostra no gráfico 4, indica um maior acometimento da Febre Maculosa em homens entre 54 a 64 anos, como mostra o gráfico 5, com 193 casos registrados com média de 72%, contra 76 casos registrados de mulheres entre 21 a 30 anos, gráfico 5, com média de 28%. Somado a maior porcentagem de casos em zonas rurais, se conclui que a doença estudada acomete mais os homens de devido ao contato diretos dos trabalhadores rurais com os carrapatos potencialmente infectados com esse patógeno.

Gráfico 4: Porcentagem média de nº de casos de Febre Maculosa no Brasil por Gênero nos anos de 2014 a 2015.



Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net.

Gráfico 5: Número de casos de Febre Maculosa no Brasil por faixa etária entre 2014 a 2015

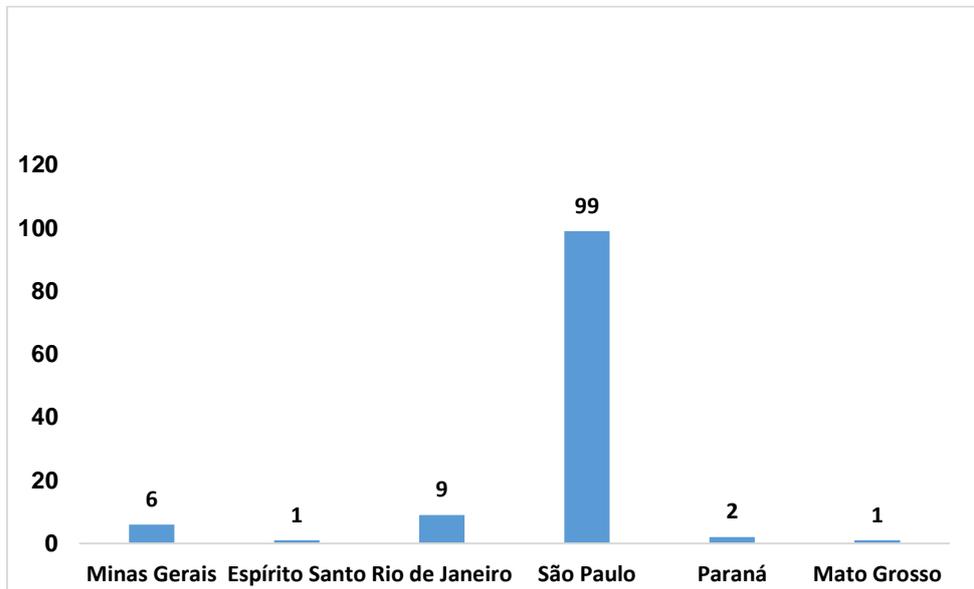


Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net, 2016.

Também foi avaliado o número de óbitos por Febre Maculosa nos anos de 2014 a 2015 com uma letalidade de 46,8 %, sendo 99 óbitos confirmados só

no estado de São Paulo, somado a outros valores, e tendo um total de 118 óbitos confirmados distribuído nos principais estados do país, como mostra o gráfico 6.

Gráfico 6: Número de óbitos por Febre Maculosa no Brasil avaliados no ano de 2014 a 2015.



Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net, 2016.

4. DISCUSSÃO

Estudos apontaram que o cão é um animal reservatório de extrema importância para a vigilância epidemiológica, devido a sua proximidade com o homem, logo, o controle nos números de parasitas, dificulta o contato com os agentes causadores de diversas patógenos, além de prejudicar o seu ciclo de vida (FORTES, F. S.; BIONDO, A. W.; MOLENTO, M. B, 2011). Carrapatos são ectoparasitas obrigatórios, não permanentes e hematófagos estritos. Sua distribuição é mundial com predominância em regiões zoogeográficas, parasitando uma ampla espécie de vertebrados. Durante as coletas dos ectoparasitas nas residências de zonas urbanas nas cidades satélites do DF, foi percebido que a quantidade de ectoparasitas é relativamente pequena, o que pode ser explicado por conta dos métodos de controle, os quais são voltados para áreas de circulação do cão seja dentro de casa ou fora, tendo em vista que a parcela pequena de parasitas se hospede no animal, onde promoverá o desenvolvimento do carrapato iniciado pela fase de ovo, três fases- larva, ninfa e adultos (NUNCIO, 2014; LABRUNA, 2004).

Para que o programa de controle e tratamento tenha sua plena eficiência contra infestações do agente patogênico *R. sanguineus*, as aplicações de acaricidas deve ser feito em locais onde os carrapatos estão acometidos, seja em moradas dos cães, gramas, frestas de paredes. Em casos de terrenos arenoso, se faz necessária a retirada da camada superficial de areia, expondo assim as teleóginas ao produto acaricida possibilitando que 95% dos ectoparasitas sejam atingidos (LABRUNA, 2001; MILAGRES, 2010)

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) ocorre de forma esporádica em diversas regiões do Brasil, com destaque para as regiões Sudeste e Sul, onde são notificados os maiores índices de casos confirmados. A FMB está presente em áreas urbanas, periurbanas e rurais, com ênfase para a última, onde encontra-se um maior número de casos. (MOLIETERNO, 2009). Tal enfermidade acomete majoritariamente a faixa etária entre 40 e 59 anos economicamente ativa principalmente o sexo masculino (SILVA et al, 2014), que tenha frequentado áreas de vegetação arbustiva, matas, corpos d'água e pessoas que exercem atividades rurais, ou que possam ter tido contato com animais como: equinos,

bovinos, capivaras, ovelhas, cães e gatos, ou que tenha entrado em contato direto com próprio ectoparasita (PINTER *et al*, 2011). Devido a dinâmica sazonal do carrapato *Amblyomma cajennense* principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, ocorrem infecções durante todo o ano, entretanto, entre os meses de julho a dezembro nota-se um crescimento no número de caso, principalmente no mês de outubro, no qual as larvas e ninfas, que diferente do carrapato adulto, além da difícil identificação pelo seu menor porte, possuem uma picada menos dolorosa, aumentando assim o período de parasitismo e de chances de transmissão do patógeno (MOLITERNO, 2009).

Nos anos de 2007 a 2015 foi observada um aumento nos números de casos suspeitos de Febre Maculos, entretanto, os números de casos confirmados apresentam elevada variação (como mostrado no gráfico 1). Se observou nos anos de estudo que as altas taxas de letalidade registradas na região Sudeste do país, mais precisamente na região de São Paulo, porém casos de incidência mais altas estão sendo registrados na região Sul, em Santa Catarina, além de serem registrados casos preocupantes da presença da espécie de *Rickettsia* encontradas em carrapatos nas regiões de Mato Grosso do Sul e Rondônia, onde se percebe a expansão da Febre Maculosa no Brasil (LABRUNA, 2005; ALMEIDA, 2013; OLIVEIRA *et al*, 2016).

Foram relatados casos de óbitos no sul do Brasil, nos ares de transição nas regiões do estado de São Paulo, indicando uma possível ocorrência de *Rickettsia rickettsii*, onde esses registros indicam uma preocupação à saúde pública, sendo preciso destacar a necessidade de mais investigações sobre as astirpes que ocorrem nessas regiões (OLIVEIRA, 2015).

O diagnóstico nos primeiros dias é dificultado devido os sintomas se apresentarem de forma sistêmica e inespecífica, similares a diversas doenças comuns a população como: dengue, malária, pneumonia causada por *Mycoplasma pneumoniae*, salmonelose e hepatite viral (BRASIL, 2005). O principal achado clínico para diagnóstico da FMB é o exantema maculopapular, surge entre o terceiro e quinto dia da doença, com predomínio nos membros inferiores, palmas das mãos e plantas dos pés (VRANJAC, 2003). Entretanto, não deve-se ater somente a tal achado, uma vez que o mesmo pode ser

confundido com outras doenças exantemáticas como: sífilis, meningococemia, enterovirose e infecções por *Streptobacillus moniliformis* (LEMOS *et al*, 2014).

Os sinais clínicos em seres humanos surgem por volta do 2º ao 14º dia após o contato com o agente etiológico da FMB (NOGUEIRA *et al*, 2005). Os sintomas surgem de forma súbita apresentando febre alta, calafrios, cefaleia, dores musculares, articulares, ósseas e prostração (MELLES *et al*, 1992). Grande parte dos hospedeiros da bactéria *Rickettsia rickettsii* não apresentam sintomas, entretanto, cachorros infectados podem manifestar dores abdominais, febre alta, anorexia, petéquias na boca, letargia, nistagmo e conjuntivite (FONTES, F. S.; BIONDO, A. W.; MOLENTO, M. B, 2011).

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que, nos anos de 2014 a 2015, o número de casos notificados de Febre Maculosa oscilou, mas mostrou-se baixo nos anos de estudo, porém a taxa de mortalidade foi considerada alta se fizermos uma proporção com o número de casos confirmados com o número de óbitos, dados que mantêm o Ministério da Saúde em alerta. Evidenciou-se que o gênero mais acometido pela FMB foi o masculino e que a zona infectada que apresentou o maior número de casos foi a rural, por apresentar potencial contato direto com ectoparasitas infectados, seguida de zonas urbanas nos anos de estudo desta pesquisa. Estudos apontaram que o cão é um animal reservatório de extrema importância para a vigilância epidemiológica, uma vez que seu controle implica na diminuição dessas enfermidades fazendo com o que o contato com o homem e esses parasitas seja reduzida.

Entretanto, a melhor forma de controlar os casos é, claramente, a devida educação da população quanto aos riscos de entrar em áreas onde carrapatos estão presentes. Sendo de extrema importância a realização de novas pesquisas com estudos mais aprofundados, para que se possa fazer um maior levantamento de dados de coleta, contando com uma maior sensibilização dos profissionais da saúde para este agravo.

6. REFERÊNCIAS.

ALMEIDA, R, F; GARCIA M, V, CUNHA, R, C; MATIAS, J, ARAUJO e Silva, E et al. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. *Exp Appl Acarol*. 2013;60(1):63–72.

ARRAIS, R, C. Ocorrência de patógenos Transmitidos por carrapatos (*Anaplasma ssp*, *Babesia ssp*, *Ehrlichia ssp*, *Hepatozoon ssp* e *Rickettsia ssp*) em lobo guará (*Chrysosyoun brachyurus*) e cães domésticos da região do parque Nacional da Serra da Canastra. São Paulo, 2013. (Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo).

ARAÚJO, P.M.; NAVARRO, M.B.M.A.; CARDOSO, T.D.A. Febre Maculosa no Brasil: **estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica**. *Cad. de Saúde Coletiva*, 2015, Rio de Janeiro, 23(4): 354-361.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância em Saúde. Vol. Único. Brasília, 2015.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2005.

CHAREONVIRIYAPHAP, T et al. Dual exposure of *Rickettsia typhi* and *Orientia tsutsugamushi* in the field-collected *Rattus* rodents from Thailand. **Journal of Vector Ecology**. Tailândia, jun. 2014. Disponível em: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=6cf7b0aa-6789-4da0-bd8b-db491d5c2399%40sessionmgr105&vid=0&hid=125>

COSTA, A, P et al. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. Among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Resvista Braz. J. Vet. Parasitol, Jaboticabal**, v. 24, n. 1, p. 28-35, jan-mar. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpv/v24n1/1984-2961-rbpv-24-1-28.pdf>

COSTA-JUNIOR et al. Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. **Vet Parasitol.** 2012, v. 188, n. 2, p. 160-163. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.015>. PMID:22516643

COUTO, D, V et al. Brazilian Spotted Fever: the importance of dermatological signs for early diagnosis. **An Bras Dermatol.** 2015, v. 90, n. 2, p. 248-250. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4371677/>

DANTAS-TORRES, F. Ticks on domestic animals in Pernambuco, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** Jaboticabal. v. 18, n. 3, p. 22-28, jul-set. 2009.

DEL FIOLE FS.; Junqueira FM.; Rocha MCP.; Toledo MI.; Filho SB. A febre maculosa brasileira. *Rev Pan de Salud Púb* 2010 jun; 27(6):461-6.

DEMONER, L, C et al. Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.** 2013, v. 4, n. 3, p. 542-546. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.07.006>. PMID:24209494

ESTRADA, Dora Amparo et al. Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Uberaba, v. 39, n. 1, p. 68-71, Feb. 2006 .

FORTES, F.S; BIONDO, A.W; MOLENTO, M.B. Febre Maculosa Brasileira em cães. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 32, n. 1, p. 339-354, jan./mar. 2011.

GAZI, M et al. Discovery of a Protective *Rickettsia prowazeki* Antigen Recognized by CD8+ T Cells, RP884, Using an *In Vivo* Screening Platform. **Plos One.** v. 8, n. 10, pag. 1-10, out, 2013. Disponível em: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=2974ddb2-889a-49ed-bb2a-a4159e705598%40sessionmgr104&vid=1&hid=125>

GOMES, Ricardo et al. Resposta immune-humoral de búfalos contra *Anaplasma marginale*. Brasil, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612008000200003>

GRISI, L. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em Bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

KANTOS, M. et al. Prevalence and seasonal abundance of ticks on dogs and the role of *Rhipicephalus sanguineus* in transmitting *Babesia* species in Maidugiri, North- Eastern Nigeria. **Veterinary Word**. Nigéria, v. 7, p. 119-124, march. V. 7, n. 7. Jan. 2014.

KRAWCZAK, F, S et al. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**. 2014

LABRUNA, M.B. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, p.123-124, 2004.

LABRUNA, M.B; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. *Clínica Veterinária*, v.30, p.24-32, 2001

LABRUNA, M,B, et al. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondônia, Brazil. *Vet Parasitol*. 2005;127(2):169–74.

LEMOS, E.R.S.; ROZENTAL, T.; MONTEIRO, K.J.L. Diagnóstico Diferencial entre Febre Maculosa Brasileira e o Dengue no contexto das doenças febris agudas. *Rev Patol Trop* Vol. 43 (3): 241-250. jul.-set. 2014.

LUZ, H, B. et al. Carrapatos parasitando cães em uma área insular do estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro. N. 36. vol 4. p. 437-442, out/dez. 2014

MELLES, H.H.B; COLOMBO, S; SILVA, M.V. Febre Maculosa: isolamento de *Rickettsia* em amostra de biópsia de pele. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 34(1); 37-41, jan/fev, 1992.

MILAGRES, B. S; [PADILHA, A. F.](#); Barcelos, R; GUIMARAES, G.; MONTANDON, C. ; PENA, D. C.; NIERI, F. ; SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; [LABRUNA, M. B.](#); BOUYER, D.; FREITAS, R. N.; Mafra, CL; WALKER, D. H.; [GALVAO, M. A. M.](#) . Investigation of Rickettsia in Synanthropic and Domestic Animals and in their Host from two areas of low endemicity for Brazilian Spotted Fever, in the east Region of Minas Gerais state, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 83, p. 1305-1307, 2010.

MILAGRES, B. S; [PADILHA, A. F.](#); MONTANDON, C.; PACHECO, R. C.; [LABRUNA, M. B.](#); FREITAS, R. N.; MAFRA, CL; WALKER, D. H.; [GALVAO, M. A. M.](#) Spotted fever group Rickettsia in small rodents from areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the eastern region of Minas Gerais state, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.88, p.937 - 939, 2013

MOLITERNO, F.M. Febre Maculosa Brasileira: aspectos epidemiológicos e laboratoriais dos casos ocorridos no estado do Rio de Janeiro no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2008. FIOCRUZ. Mestrado em Medicina Tropical, Rio de Janeiro, 2009.

NICHOLSON, W, L et al. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Rev. Trends Parasitol**, v. 26, n. 4, p. 205–212. Abr, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20207197>

NOGUERAS, M, M et al. Molecular Detection of Rickettsia typhi in Cats and Fleas. **Plos One**. v. 8, n. 8, p. 1-8, ago, 2013. Disponível em: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=8f68d99b-01b0-481b-89f6-c7584a93a052%40sessionmgr102&vid=0&hid=125>

NOGUEIRA, A.H.C. et al. Febre Maculosa. *Pesquisa & Tecnologia*, vol. 2, n.2, Jul-Dez 2005.

OLIVEIRA, S, V; PEREIRA S, V, C; SILVA, P, M, R, B; PEREIRA J, M; GOMES V; AMORIN, M et al. Vigilância de ambientes da febre maculosa brasileira e

outras riquetsioses: a etapa inicial de uma proposta para a formação de rede. Rev Pan-Amaz Saude. 2015;6(3):67–71.

OLIVEIRA, S.V et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases (2016) 22:22.

OTRANTO, D et al D, Application of 10 % imidacloprid/50 % permethrin to prevent Ehrlichia canis exposure in dogs under natural conditions. Resvi. Vet Parasitol, v. 3-4, n. 153, p. 320-328, Mai, 2008.

PINTER, et al. Febre maculosa brasileira. Bol Epidemiol Paulista. 2011;8(1):3-31.

RAMOS, R et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). Parasitol Res 2010; v.107, n. 5, p. 1115-1120. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1979-7PMid:20680344>

RIKIHISA, Y. Anaplasma Phagocytophilum and Erlichia chaffeensis: subversive manipulators of host cells. Nature reviews Microbiology. v. 8, n. 8, p. 328- 339, Mai, 2010. Disponível em: <http://www.nature.com/search?order=relevance&q=Ehrlichia%20canis>

SILVA, G, C et al. Occurrence of Ehrlichia canis and Anaplasma platys in household dogs from northern Parana. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2012, v. 21, n. 4, p. 379-385. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612012005000009.PMid:23207986>

SILVA et al. Febre maculosa: uma análise epidemiológica dos registros do sistema de vigilância do Brasil. Rev. Scientia Plena 10, 047501, 2014.

SOUZA, E, J. et al. Ação do fungo Beauveria bassiana associado a gel polimerizado de celulose no controle do carrapato Anocentro nitens em testes

de campo. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica**. Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 163-169, out. 2009.

SPOLIDORIO, M, G et al. Molecular detection of *Hepatozon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiaba, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 2011, v. 20, n. 3, p. 253-255, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000300015.PMid:21961759>

STANNECK D, et al. The synergistic action and release kinetics of 10 % imidacloprid and 4.5 % flumethrin in collars applied for ectoparasite control in dogs and cats. **Revis. Parasit Vectors**, v.5, n. 73, p. 1-4. Abr, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22498105>

STANNECK, D; FOURIE, J, J. Imidacloprid 10 % / Flumethrin 4.5 % Collars (Seresto®, Bayer) Successfully Prevent Long-Term Transmission of Ehrlichia canis by Infected Rhipicephalus sanguineus Ticks to Dogs. **Parasitol Res**, n. 112, p. 21-32. Ago, 2013.

VRANJAC, A. Varicela, difteria e febre maculosa brasileira: aspectos epidemiológicos no Estado de São Paulo. **Rev. Saúde Pública** 2003;37(6):817-20

VIEIRA, A, M, L. et al. **Manual de vigilância acarologia**. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/downloads/arquivos-de-febre-maculosa/manual_vig_acarologica.pdf

VIEIRA, T, S, W, J et al. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural áreas from Parana State, Brazil. **Revista brasileira de Parasitologia Veterinária**. 2013, v. 22, n. 1, p. 104-109. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000100019.PMid:24252955>

WOOD, D, O et al. Establishment of a Replicating Plasmid in Rickettsia prowazekii. **Revista Plos One**. v. 7, n. 4, p. 1-6, Abri, 2012. Disponível em: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=4d8e0e16-77f3-4db8-8fb7-c445b3ec0305%40sessionmgr103&vid=1&hid=125>.