



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CAMPINA GRANDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS – PB

DIROFILARIOSE CANINA NO LITORAL DA PARAÍBA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária.

IVANA FERNANDES VIDAL

PATOS – PB
OUTUBRO – 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CAMPINA GRANDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS – PB

DIROFILARIOSE CANINA NO LITORAL DA PARAÍBA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária.

IVANA FERNANDES VIDAL

Orientador: Prof. Dr. Almir Pereira de Souza

PATOS – PB
OUTUBRO – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

V648d Vidal, Ivana Fernandes
Dirofilariose canina no litoral da Paraíba / Ivana Fernandes Vidal. –
Patos, 2014.
84f.: il. color.

Tese (Doutorado em Medicina veterinária) - Universidade
Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

“Orientação: Prof. Dr. Almir Pereira de Souza”

Referências.

1. Epidemiologia. 2. Terapêutica. 3. Cães. 4. *Dirofilaria immitis*.
5. Vetores. I. Título.

CDU 616:619

IVANA FERNANDES VIDAL

DIROFILARIOSE CANINA NO LITORAL DA PARAÍBA

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Pereira de Souza - Orientador
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/ CSTR/UFCG

Profa. Dr. Sérgio Ricardo de Araújo Melo e Silva
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG

Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG

Prof. Dra. Valeska Shelda de Melo
Departamento de Medicina Veterinária Centro de Ciências Agrárias/CCA/UFPB

Prof. Dra. Renata Santiago Alberto Carlos
Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais/ UESC/ILHEUS-BA

AGRADECIMENTOS:

A Deus por me ter presenteado com o conhecimento da sua palavra e por me fazer tê-la como lâmpada para os meus pés.

Aos meus pais, IVO e RAMILDA, que com simplicidade e sabedoria, me ensinaram valores. A minha mãe em especial, por sua garra em lutar pela nossa formação. As minhas irmãs Irony e Ilânia e meus sobrinhos Arthur, Mateus, Ananda e Enzo, que sempre compreenderam minha ausência, quando não estava reunida a todos por atividades da pesquisa.

Ao meu orientador, Professor Dr. Almir Pereira de Souza, por acreditar na minha capacidade de realizar este trabalho. As horas dedicadas para me orientar, sempre com muita sabedoria, respeito e paciência e acima de tudo agradeço a sua amizade. Meu eterno OBRIGADO.

A Professora Gílcia Aparecida, pelo apoio e orientações essenciais para a realização do segundo artigo.

Aos Colegas Amanda Valéria, Regina Nóbrega, Thyago Gurjão, Tereza Rotondano, Vanessa Lira, pela ajuda na coleta das amostras.

Aos membros da banca Profa. Dra. Ana Célia R. Athayde, Profa. Dra. Valeska Shelda, Prof. Dr. Antônio Flávio, prof. Dra. Renata Santiago, por terem aceitado participar da apreciação e avaliação desta pesquisa.

Aos proprietários de Duck, Luciente e família por acreditar em nossa pesquisa e autorizar o tratamento do animal.

A Duck por ser um excelente cão e nos ajudar no seu tratamento. A EMMY FERNANDES, minha filhinha de coração, que me inspira e ensina todos os dias a amar e respeitar os animais.

Enfim, a todos aqueles que durante esses três anos e meio estiveram presentes em minha vida e me mostraram seu apoio.

RESUMO

VIDAL, I.F. Dirofilariose canina no litoral da Paraíba. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) 84f. – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2014.

Objetivou-se com essa pesquisa, conhecer a situação epidemiológica da *Dirofilaria immitis* na região Metropolitana de João Pessoa, Paraíba. No capítulo um objetivou-se estimar a prevalência da doença em cães. Para isso, 301 cães foram avaliados através das técnicas de Knott e do teste ELISA, observando-se uma prevalência de 0,33%. No capítulo dois buscou-se identificar os possíveis culicídeos responsáveis pela manutenção do ciclo da doença nessa área. Para pesquisa do vetor, utilizaram-se armadilhas luminosas do tipo CDC, capturadores de Castro e larvitrapas. A coleta foi realizada no peridomicílio da casa do cão infectado. Em um período de um ano, foram coletados 322 espécimes de culicídeos adultos em dez espécies diferentes e 543 formas imaturas de *S. (S.) albopicta*. Observou-se que *S. (S.) albopicta* e *Oc. Scapularis*, já conhecidos como vetores em outras regiões do mundo obtiveram a maior frequência e podem estar envolvidos na transmissão. No terceiro capítulo descreveu-se os efeitos de um novo protocolo de tratamento para a *D. immitis* constituído pela associação de ivermectina (50 mcg/kg/dia) e doxiciclina (10 mg/kg/BID). O tratamento foi realizado em um cão SRD macho e naturalmente infectado, As drogas foram usadas de forma isoladas, sendo uma a cada mês. O paciente foi avaliado através da realização das análises hematológicas, bioquímicas, biomarcadores cardíacos, exames de imagem, provas sorológicas e parasitológicas. Aos trinta dias iniciais do tratamento com ivermectina, o animal se tornou amicrofilarêmico. A dosagem sérica da enzima CK-MB e cTnI revelou dano pulmonar mas não ao cardiomiócito. No exame radiográfico do tórax observou-se discreto aumento da área cardíaca. No ecodopplercardiograma foi constatada insuficiência valvar pulmonar. A tomografia aos dezoito meses de tratamento, demonstrou campos pulmonares com aumento difuso do grau de atenuação radiográfica, com padrão intersticial difuso. Aos dezoito meses de tratamento o teste ELISA ainda demonstrou uma discreta reação, indicando ainda a presença de antígenos. Observando-se o exposto, pode-se considerar que este constitui um protocolo seguro, todavia, um período ainda maior de tratamento é necessário para que todos os antígenos sejam eliminados.

Palavras chaves: Epidemiologia, terapêutica, cães, *Dirofilaria immitis*, vetores

ABSTRACT

VIDAL, I.F. Canine heartworm in coastal Paraíba. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) 84f. – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2014.

In chapter one, we aim to know the epidemiological situation of *D. immitis* in dogs in the metropolitan region of João Pessoa, Paraíba. In chapter two, we sought to identify the possible culicids responsible for maintaining the disease cycle in this area. Furthermore, in chapter three, we aimed to describe the effects of a new treatment protocol consisting of ivermectin combined with doxycycline. 301 dogs were tested for the presence of dirofilariasis by Knott method and the ELISA test. The prevalence was 0.33%. For searching the vector, we used CDC light traps, Castro grabbers and larvitrap. The collection was made peridomiciliary of the infected dog. 322 specimens of adult culicidae samples were collected from ten different species and 543 immature forms of *S. (S) albopictus*. It was observed that *S. (S) albopicta* and *Oc. scapularis* had the highest frequency. Therefore, either of these two species considered may perform the transmission, since they are already known as vectors of *D. immitis*. The treatment was performed on a SRD male dog and naturally infected by *D. immitis*. The drugs were used isolated (ivermectin and doxycycline). The patient was evaluated by performing haematological, biochemical analysis, cardiac biomarkers and image exams and serologic tests and parasitological. The first thirty days of treatment with ivermectin, the animal became amicrofilaremic. The serum levels of CK-MB and cTnI showed pulmonary but not cardiomyocyte damage. On thorax radiographic examination was observed by VHS method cardiac measurement of 10.7 cm. In doppler echocardiography, we found pulmonary valve insufficiency. Tomography were performed at eighteen months showed lung fields with diffuse increase of radiographic attenuation degree with diffuse interstitial pattern. Eighteen months after starting treatment the ELISA test still showed a slight reaction, further indicating the presence of antigens. Observing the treatments results, we considered that this constitutes a secure protocol, however, an even longer period of treatment is necessary so that all antigens are eliminated.

Keywords: Epidemiology, therapy, dogs, *Dirofilaria immitis*, vectors.

SUMÁRIO

	Pág.
1. Introdução	11
2. Objetivos	13
3. Referências	14
4. Capítulo I - Prevalência da <i>Dirofilaria immitis</i> em cães na região litorânea do Estado da Paraíba – Brasil	16
4.1 Abstract.....	17
4.2 Resumo	18
4.3 Introdução	18
4.4 Material e métodos	19
4.5 Resultados	21
4.6 Discussão	21
4.7 Referências Bibliográficas.....	24
5. Capítulo II - Potenciais vetores de <i>Dirofilaria immitis</i> na Região Litorânea do Estado da Paraíba, Brasil	29
5.1 Abstract	29
5.2 Resumo	29
5.3 Introdução	30
5.4 Material e métodos	31
5.5 Resultados	32
5.6 Discussão	36
5.7 Referências Bibliográficas.....	37
6. Capítulo III - Uso da associação de ivermectina com doxiciclina no tratamento em um cão naturalmente infectado por <i>Dirofilaria immitis</i> – Relato de Caso	40
6.1 Abstract	41
6.2 Introdução	42
6.3 Relato de caso	43
6.4 Discussão	43
6.5 Sources and manufacturers	54
6.6 Referências	54
7. Considerações Finais	56

8. Anexos	57
8.1 Questionário Epidemiológico	57
8.2 Normas para elaboração da tese.....	59
8.3 Instruções aos Autores/Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária	62
8.4 Instruções aos Autores/ Acta Scientiae Veterinariae	58

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

CAPÍTULO II	Pág.
Figura 1. A - Cão naturalmente infectado por de <i>D. immitis</i> identificado na Praia da Penha; B - Domicílio do cão naturalmente infectado por <i>D. immitis</i>	33
Figura 2. A - Peridomicílio da casa do cão naturalmente infectado por <i>D. immitis</i> , mostrando grande cobertura vegetal e abundância em cursos de água. B - Armadilha luminosa tipo CDC, utilizada para a coleta de culicídeos	33
Figura 3. A - Capturador de Castro utilizado na coleta de culicídeos. B - Larvitampas utilizadas para coleta de formas imaturas de culicídeos	34
Figura 4 - Distribuição mensal das espécies de culicídeos coletados na Praia da Penha, João Pessoa, Paraíba, Brasil, no período de maio de 2013 a maio de 2014	34
Figura 5 - Distribuição mensal de larvas de <i>Stegomyia stegomyia albopicta</i> coletados na Praia da Penha, João Pessoa, Paraíba, Brasil, no período de maio de 2013 a abril de 2014	35

CAPÍTULO III

Tabela 1. Valores da bioquímica sérica e marcadores cardíacos de um cão portador de <i>Dirofilaria immitis</i> antes e durante o tratamento com a associação 10mg/kg de doxiciclina e 50 mcg/kg de ivermectina	48
Figura 1. A -.Teste ELISA de um cão portador de <i>Dirofilaria immitis</i> realizado antes do tratamento. B -.Teste ELISA Após dezoito meses do início do mesmo. Observar que após o tratamento o animal reagiu de forma mais discreta.....	48

Figura 2. Radiografia nas posições ventro-dorsal e latero-lateral de cão portador de <i>Dirofilaria immitis</i> , assintomático, naturalmente infectado, mostrando ausência de alterações pulmonares e discreto aumento da silhueta	49
Figura 3. Ecodopllercardiograma de cão portador de <i>Dirofilaria immitis</i> , assintomático, naturalmente infectado, mostrando insuficiência valvar pulmonar.....	49
Figura 4 Ecodopllercardiograma de cão portador de <i>Dirofilaria immitis</i> , assintomático, naturalmente infectado mostrando tamanho das câmaras cardíacas, após 18 meses do início do tratamento .	50
Figura 5. Imagens tomográficas de tórax de cão portador de <i>Dirofilaria immitis</i> , assintomático, nove meses após o início do tratamento, mostrando ausência de tromboembolismo pulmonar	51
Figura 6. Imagens tomográficas de tórax de cão portador de <i>Dirofilaria immitis</i> , assintomático, dezoito meses após o início de tratamento, evidenciando campos pulmonares com aumento difuso do grau de atenuação radiográfica com padrão intersticial difuso	52

INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por artrópodes vetores, dentre elas a Dirofilariose Canina (DC) tem sido alvo de um crescente interesse por parte de pesquisadores, sobretudo devido à re-emergência que têm sofrido nos últimos anos (GENCHI et al., 2009).

A dirofilariose tem como agente causal *Dirofilaria immitis* (*D. immitis*) que é um nematódeo pertencente à Superfamília Filarioidea, família *Onchocercidae*, subfamília *Dirofilarinae*, gênero *Dirofilaria*. O gênero *Dirofilaria* apresenta dois subgêneros, *Dirofilaria* (*D. immitis*) e *Nochtiella* (*Dirofilaria tenuis*, *Dirofilaria repens* e *Dirofilaria ursi*), ambos infectando o ser humano (ACHA; SZYFRES, 2003).

A *D.immitis* é um parasita do sistema circulatório de cães, canídeos silvestres e gatos menos frequentemente (ACHA; SZYFRES, 2003) e nos últimos anos surgiu como uma infecção zoonótica, trazendo riscos à saúde humana. É uma doença ainda considerada rara para alguns estudiosos, profissionais da área da saúde e veterinários e mesmo não sendo considerada oficialmente como um problema de saúde pública ou doença de notificação obrigatória pelos órgãos responsáveis, vem sendo alvo de um crescente interesse por parte de pesquisadores nos meios acadêmicos (SILVA; LANGONI, 2009).

Quanto a sua ocorrência, é considerada endêmica em áreas litorâneas, onde os mosquitos vetores necessários à maturação das microfíliárias (formas larvárias do parasita) são abundantes, tornando-a de fácil transmissão tanto para hospedeiros definitivos quanto para acidentais. Os hospedeiros intermediários ou vetores da dirofilariose são mosquitos da família *Culicidae*, pertencentes aos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (SILVA; LANGONI, 2009). No Nordeste do Brasil, *Stegomyia* (*S. aegypti*) e *Culex quinquefasciatus* são incriminados como os principais vetores de *D.immitis* (BRITO et al., 1999; BRITO et al., 2001)

O ciclo biológico de *D. immitis* tem duração média de 6,5 meses pós-infecção. As larvas passam por cinco estádios, desenvolvendo-se tanto no hospedeiro intermediário, que é o vetor, como no hospedeiro definitivo vertebrado (GENCHI et al., 2005). O mosquito hematófago fêmea fica infectado quando ingere uma refeição de sangue num cão microfilarêmico. As microfíliárias desenvolvem-se até o estágio infectante (L3) nos túbulos de Malpighi e depois migram para a cabeça e aparelho bucal do vetor (ATKINS, 2010; AMERICAN HEARTWORM SOCIETY, 2012).

A DC é reconhecida sobretudo nas zonas tropicais, subtropicais e em zonas temperadas (MC CALL; GUERRERO, 2010). A prevalência e a distribuição geográfica da infecção por *D. immitis* tem sido relatada em todo o mundo. Nos últimos anos, vários estudos epidemiológicos foram feitos em diferentes países, mostrando que a dirofilariose está amplamente distribuída por todo o globo, sendo que as prevalências mais elevadas são encontradas na América do Sul, incluindo o Brasil (ARANDA et al., 1998; MONTOYA et al., 1998; ALVES et al., 1999; LABARTHE et al., 2005).

No Estado da Paraíba um estudo de prevalência foi realizado no município de Patos em 1994, onde pesquisou-se unicamente microfilárias, mostrando uma prevalência de 12,4% (ARCOVERDE et al., 1994).

A identificação dos animais infectados com *D. immitis* pode ser feita através de métodos diretos, que incluem testes com e sem enriquecimento; testes de antígeno parasitário e de anticorpos anti-dirofilária e também técnicas moleculares (VEZZANI et al., 2008).

Com relação ao tratamento da DC, este requer o uso de drogas adulticidas, dentre elas a melarsomina e a tiacetarsamida, sendo a primeira não comercializada no mercado nacional. Apesar da eficácia dos mesmos, estes fármacos possuem desvantagens, pois a maioria dos pacientes necessitam de internação durante sua administração, além de ser necessário restrição de atividades físicas por quatro a seis semanas para reduzir as graves e possíveis sequelas provocadas após a morte dos vermes adultos, como o tromboembolismo pulmonar. Observa-se ainda complicações relacionadas a reações imunomediadas, notoriamente relatadas em casos de infestações severas, devido à resposta imune severa após a morte rápida dos vermes (ATKINS, 2010; MC CALL; GUERRERO, 2010).

Apesar de a dirofilariose canina ser conhecida como doença de áreas litorâneas, e de João pessoa e sua região metropolitana oferecer condições propícias ao seu desenvolvimento, não há estudos sobre a ocorrência da dirofilariose canina no Litoral da Paraíba, assim como, nada se conhece sobre os seus potenciais transmissores. Saber a endemicidade da área para a doença é de extrema importância, visto que esse conhecimento contribui para instituição de tratamento profilático conforme necessário.

Adicionalmente, uma nova perspectiva de tratamento em cães mais eficaz vem sendo estudada nos últimos anos, com objetivo de ocasionar o mínimo de efeitos colaterais ao paciente, tanto quando se refere à toxicidade do fármaco, quanto nas consequências da embolia pulmonar causada pela morte de vermes adultos, baseando-se

na eliminação da *Wolbachia*. Bactéria esta que vive em estado de simbiose com a filária. Para isso vários protocolos a base de ivermectina e doxiciclina usadas isoladamente ou em conjunto tem sido testados observando-se redução marcante no nível desta parasitose, no entanto, um protocolo que elimine totalmente os vermes adultos no menor tempo possível, causando o menor dano ao paciente ainda se faz necessário.

Como a dirofilariose canina mostra-se amplamente distribuída em todo Brasil e no mundo acometendo diversas espécies de animais, inclusive o homem e nada se conhece sobre sua epidemiologia no Litoral da Paraíba, objetivou-se com essa pesquisa estimar sua prevalência, conhecer sua distribuição geográfica, os possíveis vetores envolvidos na sua transmissão em João Pessoa e sua região metropolitana. Objetivou-se ainda avaliar a eficácia de um novo protocolo de tratamento adulticida contra *D. immitis*, buscando-se uma alternativa eficaz e com menos efeitos nocivos aos cães.

3-Referências:

- AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **Current Canine Guidelines for the Diagnosis, Prevention and Management of Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs**, jan. 2012. Disponível em:<<http://www.heartwormsociety.org/>>. Acesso em: 05 de abril de 2014.
- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Filariasis zoonóticas. In: **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Washington: OPS, 3ed., 2003, v.3, p.284-291.
- ALVES, L.C.; SILVA, L.V.A.; FAUSTINO, M.A. MCCALL, J.W. SUPAKONDER, J. P. LABARTHE NW, SANCHEZ M, CAIRES O. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**. n.94, p. 587- 590, 1999.
- ARANDA, C.; PANYELLA, O.; ERITJA, R.; CASTELLA, J. Canine filariasis importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona (Spain). **Veterinary Parasitology** . n. 77 p. 267-275. 1998, 1998.
- ARCOVERDE, M.C.P.; ARCOVERDE, F.; QUEIROGA, E.; BRITO L.H.R. Prevalência de microfilárias em cães no município de Patos no Estado da Paraíba. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 210, 1994, Olinda. **Anais...** Olinda: 1994.
- ATKINS C. Heartworm Disease In Dogs: An Update. In: Proceedings of the WSAVA Congress Mexico City. 2005, México. **Anais eletrônicos...** México: 2005. Disponível em:<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2005&PID=10900&O=Generic>) Acessado em 6/5/2012.
- BRITO, A.C.; FONTES, G.; ROCHA EMM, ROCHA DAM, REGIS L . Development of *Dirofilaria immitis* (Leidy) in *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) from Maceió, Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. n. 94, p. 575-576, 1999.
- BRITO, A.C.; VILA-NOVA, M.C.; ROCHA, D.A.R; COSTA, L.G.; ALMEIDA, W.A.P.; VIANA LS, LOPES JR. RR, FONTES G, ROCHA EMM, REGIS L. Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. n. 17,p. 1497-1504, 2001.

- GENCHI, C.; RINALDI, L.; CASCONI, C.; MORTARINO, M.; CRINGOLI, G. Is heartworm disease really spreading in Europe? **Veterinary Parasitology**. n. 133, p.137-148, 2005.
- GENCHI, C.; RINALDI, L.; MORTARINO, M.; GENCHI, M.; CRINGOLI G. Climate and *Dirofilaria immitis* infection in Europe. **Veterinary Parasitology**. n.163, p. 286-292, 2009.
- LABARTHE, N.; GUERRERO, J. Epidemiology of heartworm: What is happening in South America and Mexico? **Veterinary Parasitology** . n. 133, p. 149-56, 2005.
- MC CALL J.W.; GUERRERO, J. Diagnosis, Prevention and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. Guidelines for Canine Heartworm Disease. **American Heartworm Society**.p. 1-14, 2010.
- MONTOYA, J.A.; MORALES, M.; FERRER, O.; MOLINA, J.M.; CORBERA, J.A. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994-1996). **Veterinary Parasitology**. n.75, p. 221-226, 1998.
- SILVA, R.C.; LANGONI, H. Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada. **Ciência Rura I**. n.39, v.5, p. 1614-1623, 2009.
- VEZZANI, D.; FONTANARROSA, M.F.; EIRAS, D.F. Are antigen test kits efficient for detecting heartworm-infected dogs at the southern distribution limit of the parasite in South America? Preliminary results. **Research Veterinary Science**. n.85, p.113-115, 2008.

CAPÍTULO I

Prevalência da *Dirofilaria immitis* em cães na região litorânea do Estado da Paraíba – Brasil

Artigo submetido ao periódico Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária
(www.rbpv.com.br)

4. Prevalência da *Dirofilaria immitis* em cães na região litorânea do Estado da Paraíba – Brasil

Prevalence of *Dirofilaria immitis* the dogs in the coastal region of the state of Paraíba – Brazil

Ivana Fernandes Vidal¹, Amanda Valéria Angelo da Silva², Regina Nóbrega de Assis², Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano³, Thyago Araújo Gurjão⁴, Vanessa Lira de Santana¹, Almir Pereira de Souza¹.

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campus de Patos, PB, Brasil

²Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Paraíba - UFPB. Areia, Paraíba, Brasil.

³Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴Curso de Medicina Veterinária, UFCG, Campus de Patos, PB, Brasil.

4.1 Abstract

This study assesses the epidemiological situation of *Dirofilaria immitis* in dogs in the metropolitan area of João Pessoa, Paraíba. A total of 301 dogs of different breeds and aged between one and fifteen years old were examined, of which 176 males and 125 females. The dogs were originated from various districts of João Pessoa, Cabedelo and Conde. The techniques used to diagnose the heartworm infection were the KNOTT method to detect microfilariae and the ELISA test to detect the parasite antigen. The results showed that only one dog was positive (0.33%). Thus, it was concluded that canine heartworm disease is relatively low, however, autochthonous on the coast of Paraíba.

Keywords: Heartworm, João Pessoa, frequency, dogs, diagnosis.

¹ Autor para correspondência: Rua Manoel Leonardo Gomes, N. 597; Bairro: São José, Cidade: Campina Grande – Paraíba, CEP: 58.401-393. Fone(83)3322-3556, 99627363; ivanafv@yahoo.com.br

4.2 Resumo

Com o objetivo de conhecer a situação epidemiológica de *Dirofilaria immitis* em cães na região Metropolitana de João Pessoa, Paraíba, foram examinados 301 cães, sendo 176 machos e 125 fêmeas, de raças e idades variadas. Os cães eram procedentes de vários bairros dos municípios de João Pessoa, Cabedelo e Conde. As técnicas utilizadas para o diagnóstico de Dirofilariose foram o método de KNOTT para pesquisa de microfilarias e o teste ELISA para pesquisa do antígeno do parasita. Apenas um cão obteve resultado positivo e a prevalência estimada foi de 0,33%. Dessa forma, observou-se que o índice de dirofilariose canina no litoral Paraibano pode ser descrito como relativamente baixo, porém autóctone.

Palavras-chaves: Dirofilariose, João Pessoa, frequência, cães, diagnóstico.

4.3 Introdução

A dirofilariose é uma parasitose causada pela *Dirofilaria immitis* (*D. immitis*) (Leidy, 1856) e é transmitida por diferentes espécies de culicídeos. Tem como hospedeiros definitivos o cão, acometendo com menor frequência o gato e acidentalmente o homem, sendo considerada uma importante zoonose pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1979 (ACHA; SZYFRES, 2003; BARBOSA; ALVES, 2006).

É descrita como endêmica em áreas litorâneas. No Brasil, a distribuição da infecção é cosmopolita, sendo relatado 47,7% na Cidade de Natal (RN) (FERREIRA et al., 2004); 29,7% em Niterói (RJ); 14% no Rio de Janeiro (LABARTHE et al., 1997); 12,5% em Santa Catarina; 12,5% em Alagoas; 12,4% no Sertão da Paraíba; 10,7% em Recife (PE) (ALVES et al., 1999); 10,47% em Belém (PA); 9,6% em Cuiabá (LABARTHE, 1997); 8,8% no Estado de São Paulo (LARSSON, 1990) e 1,1% no Rio Grande do Sul (LABARTHE, 1997).

No animal a doença tem difícil diagnóstico clínico, pois pode ser assintomática ou apresentar sintomas inerentes a muitas outras patologias, como tosse, dispneia, redução da capacidade de exercícios e, em alguns casos mais graves, caquexia. O diagnóstico definitivo baseia-se na identificação de microfilárias de *D. immitis* por meio das técnicas de concentração, dentre elas o teste de Knott e por teste imunológicos onde é possível identificar o antígeno do verme adulto (FERNANDES et al, 2000).

A dirofilariose é caracterizada como uma zoonose emergente, porém, negligenciada, visto o alto número de casos em todo o mundo que não são diagnosticados e registrados. O tratamento no cão pode ser fatal. Nos seres humanos é altamente invasivo e oneroso, a recomendação é a prevenção da doença na fonte de infecção (cão) (SILVA; LANGONI, 2009)

O único estudo relatado no Estado da Paraíba sobre dirofilariose canina foi realizado no ano de 1994 no Município de Patos, Sertão do Estado, usando-se apenas técnicas parasitológicas (ARCOVERDE et al., 1994), no entanto, nada se conhece sobre a dirofilariose canina no Litoral Paraibano.

Assim, objetivou-se com este estudo determinar a prevalência canina para *D. immitis* no litoral Paraibano por meio da pesquisa de microfilárias e da detecção de antígenos circulantes, assim como os fatores de risco para essa enfermidade.

4.4 Material e Métodos

Esse estudo é parte integrante do protocolo licenciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) UFCG, sob número 177/2014.

A área de estudo foi constituída pela cidade de João Pessoa e sua região metropolitana, localizada na porção mais oriental das Américas, com longitude oeste de 34°47'30" e latitude sul de 7°09'28". Essa região possui características geográficas de endemicidade da doença, tais como, ser região de litoral, possuir grandes áreas arborizadas e clima propício ao desenvolvimento de mosquitos, além de abundância de cursos de água, rios, lagoas e terrenos de areia, contudo, sua real ocorrência não é conhecida.

A denominação mais usual para o clima da área é o quente e úmido, com o período chuvoso ocorrendo no primeiro semestre do ano, com maior expressão entre os meses de março a agosto. Nesta época observa-se elevadas taxas pluviométricas associadas a altos valores térmicos. Já o regime seco é presente no segundo semestre, mas precisamente a partir do mês de setembro. A temperatura do ar apresenta um padrão elevado para todo o ano, oscilando entre 24,1°C e 27,2°C e a média das máximas podem ser superiores a 30°C em janeiro, fevereiro e março. A umidade relativa do ar tem a média anual de 80% e a vegetação é formada pela Mata Latifoliada Perenifólia Costeira (Mata Atlântica). Embora bastante devastada, a cidade conta com importantes resquícios da Mata Atlântica original ainda preservados (IBGE, 2009; PEREIRA, 2012).

A amostra foi calculada segundo Thursfield (2007) e as áreas investigadas foram escolhidas por sorteio, entre elas estiveram a Praia da Penha, Praia do Seixas, Mangabeira

VIII, Praia do Jacaré, Conjunto Cidade Verde, Miramar; Castelo Branco Primeiro; Jacumã e Cabedelo.

No período de agosto de 2012 a fevereiro de 2013 foram coletadas 301 amostras de sangue oriundas de cães domiciliados, machos e fêmeas, de raças e idades variadas, sempre com permissão do proprietário, por meio da assinatura em termo de consentimento exclusivo para tal fim. Os cães investigados foram escolhidos por conveniência.

Os proprietários foram entrevistados e os dados foram registrados em questionários (Anexo 1).

De cada animal foi coletado em média 10 mL de sangue em tubos a vácuo. As amostras de sangue foram obtidas por venopunção cefálica ou jugular, sendo cinco mL acondicionados em tubos com EDTA (etileno-diamino-tetracetato), 2 mL colocadas em tubos contendo citrato de sódio e três mL em tubos sem anticoagulante, sendo esta última amostra centrifugada para obtenção de soro. O processamento das amostras e a realização dos exames aconteceram nas 24 horas que sucederam a coleta.

A pesquisa de microfilárias de *D. immitis* na circulação foi realizada nas amostras de sangue acrescidas de EDTA adotando-se o teste de Knott modificado (NEWTON; WRIGHT, 1956).

Foi realizado a pesquisa da presença de antígeno do parasita adulto pelo método imunoenzimático (ELISA) através do Snap®4Dx®, (IDEXX Laboratories, USA) seguindo as instruções do fabricante. Este teste possui características de 99,2% de sensibilidade e 100% de especificidade. O diagnóstico foi firmado por evidência sorológica do antígeno do parasita adulto e/ou pela presença de microfilárias em microscopia óptica. Para certificação da presença de casos autóctones coletou-se amostras de sangue de cães que nasceram e foram criados nessas regiões, sem histórico de viagens (cães nativos).

A análise estatística foi realizada com base na associação entre as variáveis independentes (variáveis epidemiológicas) e aquelas dependentes (resultados de ELISA e teste de Knott modificado). Foi considerada a variável dicotômica denominada resultado, que assumiu o valor 1 nos cães caracterizados como positivos e 0, se negativo. Calculou-se como medida de associação o teste do Qui-quadrado (χ^2), e exato de Fischer, ambos com intervalo de confiança de 95% (THURSFIELD, 2007). A análise de fatores de risco foi efetuada em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Na análise univariada, as variáveis que apresentaram um valor de $p \leq 0,2$ pelo teste de qui-quadrado

ou teste exato de Fisher, quando indicado, foram selecionadas para a análise multivariada, utilizando-se a regressão logística múltipla (HOSMER; LEMESHOW, 2000). Todas as análises foram efetuadas com o programa SPSS 15.0 *for Windows*.

4.5 Resultados

Dentre os trezentos e um cães avaliados, apenas 16 tinham raça definida, sendo 125 fêmeas e 176 machos com idade entre um e 16 anos de idade.

Dentre estes, apenas um animal obteve resultado positivo no teste parasitológico e sorológico, o que refere uma prevalência de 0,33% para a dirofilariose canina nesta área. Nenhum dos fatores de riscos avaliados se mostrou significativo na análise estatística realizada.

A Praia Penha, localidade onde a doença foi encontrada, é uma área residencial da orla marítima em João Pessoa, Estado da Paraíba, Região Nordeste do Brasil. Nessa área foram investigados 46 cães. A área específica onde a doença foi observada foi na vila dos pescadores, na região beira-mar, uma área ainda pouco urbanizada, com edificações de um só pavimento em sua grande maioria e com condições inadequadas de saneamento básico. A Praia da Penha preserva ainda grande cobertura vegetal de mata nativa com a presença ao norte do Rio do Cabelo e ao sul com Riacho de Jacarapé (SILVA, 2013).

4.6 Discussão

Os achados observados na região da Praia da Penha corroboram com aqueles relatados por Brito (1999) e Ahid e Lourenço-de-Oliveira (1999) que afirmaram que fatores como a temperatura de clima tropical aliada a outros como a abundância de reservatórios de água, presença da mata favorecendo uma variedade de artrópodes vetores, além das condições sanitárias precárias são condições que favorecem a ocorrência da doença.

O cão encontrado positivo tinha seis anos de idade, não tinha raça definida, possuía pêlos longos, não havia recebido qualquer tipo de vacinação e vermifugação, alimentava-se de ração e comida caseira e usava no momento do diagnóstico coleira repelente de pulgas e carrapatos. Residia desde seu nascimento em uma casa localizada na vila dos pescadores localizada na Praia da Penha e seu proprietário era um morador nativo desta área. O animal era semi-domiciliado, ou seja, vivia no quintal de casa, porém, tinha acesso ao peridomicílio constituído pelo mar, mata e o rio. Esse animal apresentou uma baixa microfilaremia e se apresentou sob a forma assintomática da doença. Um outro animal da mesma residência, porém, criado apenas no interior da casa também foi submetido aos testes com resultado negativo.

Nesse estudo a infecção patente (microfilarêmica) teve o mesmo resultado que a infecção oculta (amicrofilarêmica), no entanto, não houve grande frequência de cães infectados, apesar de ser uma região litorânea com condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Arcoverde et al. (1994) relataram no Sertão da Paraíba uma prevalência de 12,4% para *D. immitis* em pesquisa realizada pela técnica de Knott. Diante desse fato, pode-se considerar pelos resultados obtidos no presente trabalho, que assim como no restante do Brasil, o Estado da Paraíba possa estar passando por um declínio dessa modalidade de infecção. Observação semelhante foi relatada por Carlos et al. (2007) onde observou-se uma prevalência de 0% em Ilhéus e Itabuna no Estado da Bahia. Um importante decréscimo de positividade foi também constatado por Souza e Larsson (2001) no estado de São Paulo. Labarthe e Guerrero (2005) também relataram uma redução da prevalência de dirofilariose no estado do Rio de Janeiro de 21,34% em 1990 para 3,8% em 2003, assim como em Itacoatiara e região oceânica de Niterói com diminuições de 37% para 15% e de 43,4% para apenas 0,6% respectivamente.

Assim como o achado na Praia da Penha, Cirio (2005) e Leite (2007) também encontraram baixas prevalências de *D. immitis* em cães semi-domiciliados (1,0% e 0,9%) e domiciliados (4,2% e 3,0%) respectivamente, em bairros com condições sanitárias semelhantes a área dessa pesquisa localizadas no Município de Guaratuba, estado do Paraná, indicando que mesmo em áreas de baixa prevalência, mas que reúnam condições para a manutenção do vetor e do portador, uma vigilância ativa deve ser mantida de modo a monitorar a ocorrência da doença na região, já que se conhece a manifestação da doença como forma oculta.

Em entrevista realizada com os proprietários nesse estudo, observou-se que quase totalidade deles afirmaram não ter o conhecimento da doença quando arguidos sobre a mesma e não fazer nenhuma prevenção em seus cães contra ela. Isso pode ser explicado pelo fato de a grande maioria dos proprietários dos cães serem pessoas com baixo grau de instrução e baixo grau de escolaridade, onde 56% dos mesmos possuíam até no máximo o primeiro grau concluído. Outro fator a ser considerado é que a maior parte da amostra foi constituída por famílias de baixa renda, onde 57% recebiam até no máximo dois salários mínimos, o que os impossibilitava de acompanhamento médico veterinário para esclarecimentos sobre a proteção.

Acredita-se que alguns fatores possam ter levado à restrição dessa zoonose na área em estudo, pois de um total de 301 animais avaliados, pelo menos 43 (14,3%) recebiam medicação preventiva regularmente para controle de carrapatos a base de ivermectina e

outros 156 (52%) recebiam vermifugos em forma de comprimidos de composição variada contendo ou não ivermectina. Apesar deste dado não ter se mostrado significativo neste trabalho, sabe-se que a administração de lactonas macrocíclicas como a ivermectina garante a eliminação de larvas com menos de dois meses de idade. Além disso, esses fármacos reduzem a microfilaremia, impedem o desenvolvimento de vermes imaturos e comprometem o sistema reprodutivo de fêmeas de *D. immitis* (VENCO et al., 2004). Estudos mais recentes têm demonstrado que a administração mensal da ivermectina a longo prazo tem ainda propriedades adulticidas, no entanto, a completa eliminação dos parasitas adultos pode se estender até 36 meses (BAZZOCCHI et al., 2008; YOUN et al., 2012).

Considera-se dessa forma que o uso desse fármaco, muitas vezes de forma indiscriminada pelos proprietários e com o intuito de resolver a intensa e frequente infestação por carrapatos nessa região, contribua para uma menor disseminação da dirofilariose.

Um outro fator ainda a ser considerado é a ausência do mosquito vetor nas residências. Os proprietários dos cães relataram durante a entrevista não observar mosquitos em suas casas em 98% dos casos.

Acredita-se que a ação dos agentes comunitários de saúde em programa de controle de dengue, possa ter afetado também esse número, evitando a disseminação da infecção, visto que os culicídeos responsáveis pela transmissão da *D. immitis* depositam seus ovos na água ou locais secos que tendem a inundar sazonalmente. Afetando dessa forma não só o *Aedes aegypti*, incriminado como vetor em algumas regiões do Nordeste do país, mas também ainda outros culicídeos que por ventura possam estar envolvidos na transmissão (BRITO et al 1999; CIRIO, 2005).

Alguns proprietários relataram ainda ter feito o uso em seus cães de cloridrato de doxiciclina para tratamento da *Ehrlichia canis*, embora estatisticamente esse fator não tenha sido significativo acredita-se que deve ser considerado, pois sabe-se que as tetraciclina são conhecidas por destruir bactérias intracelulares do gênero *Wolbachia pipientis*, uma bactéria gram-negativa intracelular presente em um vasto número de artrópodes e helmintos, incluindo a *D. immitis*. O uso dessa droga afeta o número de *Wolbachia* intracelulares de *D. immitis*, as quais possuem um papel essencial para a função biológica e reprodutiva destes nematódeos, bem como sobrevivência de vermes adultos (MC CALL et al., 1999; LANGWORTHY et al.; 2000). Em infecções experimentais, a doxiciclina foi letal para os estágios larvais (L3 e L4) do parasita. Além

disso, observou-se que este fármaco reduz progressivamente a microfilaremia em animais infectados com formas adultas de *D. immitis* (AMERICAN HEARTWORM SOCIETY, 2012).

Segundo Machado (2005) a associação de fatores como a possível diminuição na população do mosquito vetor, a redução de populações de cães com microfírias com o uso de ivermectina injetável e a redução da capacidade reprodutiva de vermes pelo uso da doxiciclina, devem ser considerados para o encontro da baixa prevalência observada para dirofilariose canina em Florianópolis, fatores estes, observadas também no Município de João Pessoa e Região Metropolitana.

De acordo com as análises realizadas, o índice de dirofilariose canina no litoral paraibano pode ser descrito como relativamente baixo, porém autóctone. Apesar da baixa prevalência para dirofilariose canina observada na Praia da Penha, a terapia preventiva para espécie canina e felina deve ser adotada, devido as condições ambientais propícias e a ocorrência de cães positivos. Entretanto, é importante ressaltar que novos estudos referentes aos principais vetores e a possíveis reservatórios silvestres existentes sejam realizados no município para completar o ciclo epidemiológico da doença.

4.7 Referências Bibliográficas

- Ahid SMM, Lourenço - de - Oliveira R. Mosquitos vetores potenciais de dirofilariose canina na região Nordeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública* 1999; 33: 560-565.
- Alves LC, Silva LVA, Faustino MAG, McCall JW, Supakonderj P, Labarthe NW et al. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94(5):587-590.
- Acha PN, Szyfres B Filariasis zoonóticas. In: *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunesal hombre y a lós animales*. 3nd Ed. Washington: OPS, 2003.V.3, p. 284-291.
- American Heartworm Society. Epi Info [on line]. 2012. Prevention and Management of Heartworm Disease (Dirofilaria immitis) Infection in Dogs. current Canine Guidelines for the diagnosis:Available from: <<http://www.heartwormsociety.org/>>. Acesso em: 05 de abril de 2013.
- Arcoverde, MCP, Arcoverde, FA, Queiroga E, Brito LHR. Prevalência de microfírias em cães no município de Patos no Estado da Paraíba. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 210, 1994, Olinda. Anais... Olinda: 1994.
- Barbosa CL, ALVES LC. Dirofilariose canina: situação atual no Brasil. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária* 2006; 1: 57- 62.

Bazzocchi C, Mortarino M, Grandi G, Kramer LH, Genchi C, Bandi C, et al. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *International Journal Parasitology* 2008; 38: 1401-1410.

Brito AC, Fontes G, Rocha EMM, Rocha DAM, Regis L et al. Development of *Dirofilaria immitis* (Leidy) in *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) from Maceió, Alagoas, Brazil. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94(4): 575-576.

Carlos RSA, Neta ESM, Spagnol FH, Oliveira LLS, Brito RLL, et al. Frequência de anticorpos anti-erlichia canis, borrelia burgdorferi e antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet* 2007; 16 (3): 117-120.

Cirio SM. *Epidemiologia e clínica de cães portadores de dirofilariose em espaços urbanos de município dolitoral do Paraná e aspectos da histologia de Culex quinquefasciatus (Say, 1823) (Diptera, Culicidae)*. [Tese]. Curitiba: (Doutorado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná; 2005.

Ferreira DRA, Barbosa TS, Castro AU, Mariz MAS, Soares JG, Teixeira DIA, et al. Prevalência de infecções por filarídeos em cães de microrregiões de Natal, Brasil. *Ciência animal* 2004; 14 (2): 111-115.

Fernandes CGN, Silva, RR, Moura S T, Oliveira RMF. Aspectos epidemiológicos da dirofilariose canina no perímetro urbano de Cuiabá, Mato Grosso: emprego do “Immunoblot” e do teste de Knott modificado. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2000; 37 (6): 1-10.

Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. New York: John Wiley e Sons; 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. 2012. João Pessoa. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. 29 de Abril de 2012.

Labarthe NV. Dirofilariose canina: Diagnóstico prevenção e tratamento adulticida. *Clínica Veterinária* 1997; 10: 10-16, 1997.

Labarthe N, Almosny N, Guerrero J, Duque - Araújo AM. Description of the Occurrence of Canine Dirofilariasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 1997; 92(1): 47-51.

Labarthe N, Guerrero, J. Epidemiology of heartworm: what is happening in South America and Mexico? *Veterinary Parasitology* 2005; 133: 149–156.

Larsson MHMA. Prevalência de microfilárias de *Dirofilaria immitis* em cães do Estado de São Paulo. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science* 1990; 27:183-186.

Langworthy NG, Renz A, Mackenstedt U, Henkle – Duhrsen K, Bronsvort MBC, Tanya VN, et al. Macrofilaricidal activity of tetracycline against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*: elimination of *Wolbachia* precedes worm death and suggests a dependent relationship. *The Royal society* 2000; 267: 1063-1069.

Leite LC, Navarro-Silva MA, Luz E. Prevalence of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in dogs of canil municipal Guaratuba, Paraná, Brazil. *Estudo Biológico* 2007; 29(66) 73-79.

Machado ES. *Aspectos epidemiológicos de dirofilariose canina e humana, no Município de Florianópolis – SC, Brasil. Perfil de uma zoonose*. [Dissertação]. Santa Catarina : Universidade Federal de Santa Catarina; 2005

Mc Call JW, JUN JJ, BANDI C. *Wolbachia* and the antifilarial properties of tetracycline. An untold story. *Italian Journal of Zoology* 1999; 55: 7-10.

Newton NL, Wright WH. The occurrence of a dog filarid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. *Journal Parasitology* 1956; 42: 246-258.

Pereira MDB, Monteiro DCS, Silva NT, Moura MO. Avaliação quantitativa das precipitações diárias intensas na cidade de João Pessoa, Paraíba. *Revista Geonorte* 2012; 1(5):921 – 929.

Silva RC, Langoni H, Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada. *Ciência Rural* 2009; 39 (5): 1614- 1623.

Silva AG. Turismo e Impactos Sócio-Ambientais no Litoral Sul de João Pessoa – Paraíba - Brasil. *Epi Info* [online] 2013 [cited]. Available from: <http://observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal6/Geografiaso>. Acesso: agosto 2013.

Souza NF, Benigno RNM, Figueiredo M. Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães no Município de Belém do Pará, com base na microfilaremia. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária* 1997; 6 (1): 83-86.

Souza NF, Larsson, MHMA. Frequência de dirofilariose canina (*D. immitis*) em algumas regiões do Estado de São Paulo por meio da detecção de antígenos circulantes. *Arquivos Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia* 2001; 53 (3).

Thursfield M. *Epidemiologia veterinária*. São Paulo: Roca, 2004.

Venco LMC, Call JW, Guerrero J. Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of naturally acquired heartworm infections in dogs. *Veterinary Parasitology* 2004; 124: 259–268.

Youn H, Ra JC, Kim BK, Lim YS, Kim KH, Lee KE. Studies on the anti-parasitic efficacy and safety of ivermectin and pyrantel pamoate compound against *Dirofilaria immitis* in dogs. *Korean Journal Veterinary Research* 2012; 52(1): 53-56.

CAPÍTULO II

5. Potenciais vetores de *Dirofilaria immitis* na Região Litorânea do Estado da Paraíba, Brasil

Artigo submetido ao periódico Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.
(www.rbpv.com.br)

5. Potenciais vetores de *Dirofilaria immitis* na região litorânea do estado da Paraíba, Brasil

Potential vectors of *Dirofilaria immitis* in the coastal region of the state of Paraíba, Brazil

Ivana Fernandes Vidal¹; Gílcia Aparecida de Carvalho²; Almir Pereira de Souza¹

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande– UFCG, Campus Patos, PB, Brasil

²Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Garanhuns, PE, Brasil

5.1 Abstract

This study aims at identifying possible culicids responsible for maintaining the canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, cycle on the coast of Paraíba. CDC light traps, larval and Castro traps were used to collect the dipterous. The 12-kg dog naturally infected with *D. immitis* served as bait for two hours from 30 minutes before sunset. Adult and immature Culicidae were captured 14 and seven times, respectively, during a 12-month period. A total of 322 specimens of adult culicidae in 10 different species and 543 immature of *S. (S) albopictus* were collected. It was observed that *S. (S) albopicta* and *Oc. Scapularis* had the highest prevalence, the first being present throughout the year as both adult and larvae. Therefore, either *S. albopicta* or *O. scapularis* might be involved in the transmission of *D. immitis* in the studied site since these two species have been considered as a possible vector of *D. immitis* at other sites.

Keywords: culicids fauna, João Pessoa, Heartworms.

5.2 Resumo: Com o objetivo de identificar os possíveis culicídeos responsáveis pela manutenção do ciclo da *Dirofilaria immitis* no litoral da Paraíba, utilizaram-se armadilhas luminosas do tipo CDC, capturadores de Castro e larvitampas. Durante o período de 12 meses foram realizadas 14 capturas de culicídeos adultos e sete de formas imaturas. Para tanto, um cão de 12 kg naturalmente infectado por *D. immitis* foi utilizado como isca para os culicídeos durante duas horas a contar de 30 minutos antes do por do Sol. Foram coletados 322 espécimes de culicídeos adultos em dez espécies diferentes e 543 formas imaturas de *S. (S) albopicta*. Observou-se que *S. (S) albopicta* e *O. scapularis* obtiveram

a maior frequência, sendo o primeiro presente durante todo o ano nas formas adulta e larvária. Provavelmente, o *S. (S.) albopicta* e o *O. (O) scapularis* podem estar envolvidas na transmissão de *D. immitis* no local estudado (João Pessoa) visto que essas espécies já foram consideradas possíveis vetores em outras localidades.

Palavras chave: culicidofauna, João Pessoa, dirofilariose canina.

5.3 Introdução

A *Dirofilaria immitis* (*D. immitis*) (Leidy, 1856), é o agente causador da dirofilariose canina, um parasita nematoide que infecta o ventrículo direito e artéria pulmonar de cães e outros carnívoros. Esta doença tem uma ampla distribuição geográfica e várias espécies de culicídeos, dentre eles, *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* e *Mansonia* foram incriminadas como vetores (LUDLAM et al., 1970), mas a sensibilidade desses dípteros variam de região para região, como demonstrado em vários estudos (LOFTIN et al, 1995; BRITO et al., 1999; AHID et al., 2000; THEIS et al, 2000).

Pesquisas conduzidas sob condições naturais sobre a capacidade vetorial vem sendo efetuadas em diferentes partes do mundo e mostram que várias espécies de culicídeos podem estar envolvidas na transmissão de *D. immitis*, mostrando que esse parasita parece ser pouco seletivo em relação aos culicídeos transmissores (BOWMAN, 2006). Nos países asiáticos como Japão, Malásia, Taiwan e Tailândia quatro vetores naturais são conhecidos: *Stegomyia (Stegomyia) Albopicta*; *Culex tritaeniorhynchus*; *Culex (Culex) quinquefasciatus* e *Mansonia uniformis* (CHOOCHOTE et al., 1986;)

Na Austrália, o *Culex annulirostris* e *Aedes notoscriptus* são os vetores primários (RUSSEL 1985) e nos EUA 22 espécies de culicídeos foram capturadas em 17 estados, naturalmente infectados com *D. immitis*.

No Brasil, os vetores responsáveis pela disseminação da doença na região Sudeste foram *Aedes taeniorhynchus* e *Ochlerotatus (Ochlerotatus) scapularis*, (LOURENÇO DE OLIVEIRA; DEANE, 1995). No Rio de Janeiro, em Niterói, em ordem decrescente, os melhores vetores para *D. immitis* foram *O. (O). scapularis*, *A. taeniorhynchus* e *C. (C.) quinquefasciatus*, que se alternam sazonalmente em importância e o *C. (C.) quinquefasciatus* foi sugerido como sendo um bom vetor para os gatos (LABARTHE et al, 1998).

Brito et al. (1999) e Brito et al. (2001) relataram que na região Nordeste do Brasil, o *Stegomyia (Stegomyia) aegypti* e *Culex (Culex) quinquefasciatus* são os principais vetores, sendo que, em infecção experimental a partir de cão naturalmente infectado com

D. immitis, *S. (S) aegypti* apresentou melhor potencial, em relação a *C. (C) quinquefasciatus*, como vetor da *D. immitis*. Em São Luis, estado do Maranhão o *A. taeniorhynchus* e *C. (C) quinquefasciatus* foram considerados vetores potenciais da *D. immitis* (AHID; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1999). Em Pernambuco em infecções experimentais, o *C. (C) quinquefasciatus* e *S. (S) albopicta* demonstraram potencial vetor para o parasita (CARVALHO et al., 2008; CARVALHO et al., 2013)

A *D. immitis* já foi observada e sua autoctonia já fora registrada na cidade de João Pessoa (VIDAL, I. F. comunicação pessoal), sendo sua prevalência de 0,33%, em cães domiciliados. No entanto, nada se conhece sobre sua transmissão nesta área, sendo assim, objetivou-se com essa pesquisa identificar os possíveis culicídeos responsáveis pela manutenção do ciclo da doença nessa região.

5.4 Material e Métodos

Esse estudo é parte integrante do protocolo licenciado pelo comitê de ética em Pesquisa (CEP) UFCG sob o número 177/2014.

O estudo foi conduzido na Praia da Penha (longitude oeste de 34°47'30" e latitude sul de 7°09'28") bairro residencial da orla marítima, de João Pessoa, Estado da Paraíba, Região Nordeste do Brasil, motivado pela identificação de um caso autóctone de infecção por *D. immitis* (comunicação pessoal) (Fig. 1A). A localização exata dessa área é na região beira-mar (Fig.1B), as margens do Rio da Ponte, área esta com grande cobertura vegetal preservada (Fig. 2A).

Foram realizadas coletas mensais de culicídeos na Praia da Penha, de maio de 2013 a abril de 2014, em região peridomiciliar, próximo onde foi identificado um cão naturalmente infectado.

Culicídeos adultos foram coletados utilizando-se armadilhas luminosas do tipo CDC (Centers for Disease Control and prevention, Atlanta, EUA)² (Fig. 2B), pouso no cão com auxílio de dois capturadores de Castro (Fig. 3A) (BUXTON,1980) e larvitrapas (Fig. 3B) confeccionadas com recipientes plásticos pintados com tinta preta, contendo água do Rio existente nessa área (Rio da Ponte), sendo instaladas no solo para captura de larvas de culicídeos.

Um cão de 12 kg naturalmente infectado por *D. immitis* servia de isca durante duas horas a contar de 30 minutos antes do por do Sol. A captura dos culicídeos com o auxílio do capturador de Castro era realizada assim que os mesmos se aproximavam e se

² American Biophysics, Jamestown, RI USA

preparavam para o pouso. As armadilhas luminosas eram colocadas a cerca de 15 metros no entorno, na margem do Rio da Ponte.

Para identificação dos culicídeos capturados, foram usadas as chaves dicotômicas propostas por Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Os culicídeos foram dissecados para a pesquisa de larvas de *Dirofilaria immitis*, sendo a identificação dos culicídeos realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

5.5 Resultados

Durante o período de 12 meses foram realizadas 14 capturas de culicídeos adultos e sete de formas imaturas. Foram coletados 322 espécimes de culicídeos adultos em dez espécies diferentes (Fig.4) e 543 formas imaturas de *S. (S). albopicta* (Fig. 5). Não foram recuperadas larvas de *D. immitis* em nenhum culicídeo dissecado.



Figura 1. A: Cão naturalmente infectado por de *D. immitis* identificado na Praia da Penha. B: Domicílio do cão naturalmente infectado por *D. immitis*.



Figura 2. A: Peridomicílio da casa do cão naturalmente infectado por *D. immitis*, mostrando grande cobertura vegetal e abundância em cursos de água. B: Armadilha luminosa tipo CDC, utilizada para captura de culicídeos.



Figura 3.A: Capturador de Castro utilizado na coleta de culicídeos. B: Larvitrapas utilizadas para coleta de formas imaturas de culicídeos.

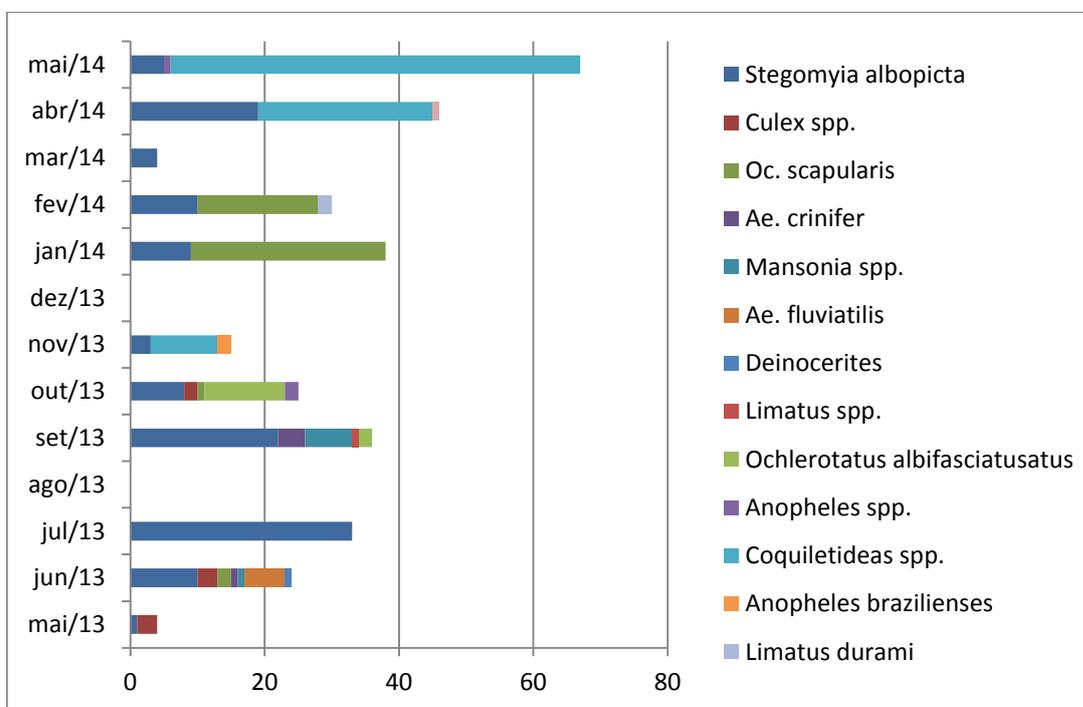


Figura 4. Distribuição mensal das espécies de culicídeos coletados na Praia da Penha, João Pessoa, Paraíba, Brasil, no período de maio de 2013 a maio de 2014.

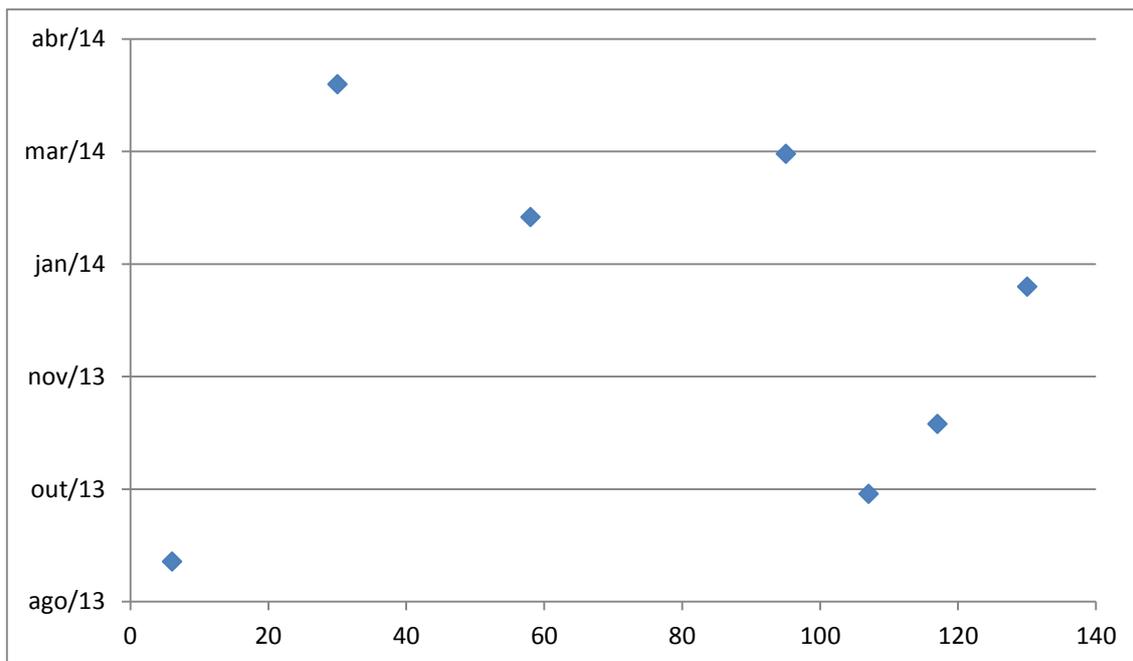


Figura 5. Distribuição mensal de larvas de *Stegomyia (Stegomyia) albopicta* coletados na Praia da Penha, João Pessoa, Paraíba, Brasil, no período de maio de 2013 a abril de 2014.

5.6 Discussão

No presente estudo foi observado que, dentre os dois métodos de coleta de culicídeos adultos as armadilhas tipo CDC foram as que atraíram a menor porcentagem de culicídeos, seguidas do capturador de Castro. Observou-se ainda como desvantagem da CDC, que esta atraiu espécies dos mais variados tipos, não se mostrando seletiva, além do mais, muitos dos culicídeos que entravam na armadilha se machucavam ao passar pela hélice existente na mesma, o que muitas vezes impossibilitava sua identificação.

A espécie predominante nesse estudo foi o *S.(S.) albopicta* (38,9%), que contabilizou 124 espécimes adultos de um total de 322, e 543 formas imaturas. Os *S.(S.) albopicta* são mais atraídos por seres humanos e convivem em zonas adjacentes a estes (CONSOLI; LOURENÇO- DE-OLIVEIRA, 1994), esse fato explica porque que a armadilha CDC se mostrou menos atrativa para os culicídeos, já que a maior parte dessa fauna era constituída por tal espécie.

As larvas de *D. immitis* foram encontradas no aparelho bucal do *S.(S.) Albopicta* na Malásia (SULAIMAN; JEFFERY 1986) e este díptero é apontado como principal responsável pela transmissão da *D. immitis* em todos os países da Ásia, sendo que a infecção natural foi relatada em uma população de culicídeos, de uma área rural do Japão (TESH, 1989). Observou-se também presença do nematóide em cães e de anticorpos anti-dirofilária em quase totalidade da população humana nesta região do Japão, o que indica exposição frequente deste parasita para a população (TESH, 1989).

Esta espécie também foi observada como vetor natural de *D. immitis* na Itália. Além disso, foi apontada a hipótese de que a presença desse culicídeo possa afetar o padrão de transmissão da dirofilariose canina em ambiente urbano e, considerando-se o comportamento agressivo antropofílico da espécie, poderão aumentar a circulação de nematóides filariais de animais para humanos (CANCRINI et al., 2003).

Embora esse culicídeo ainda não tenha sido identificado naturalmente infectado por *D. immitis* no Brasil, Serrão (2004) encontrou o índice de eficiência vetorial na população *S.(S.) albopicta* de Itaipu de 27,85% indicando que esta população pode participar da transmissão da dirofilariose no Estado do Rio de Janeiro. Carvalho et al. (2013) observaram que *S.(S.) albopicta* é o melhor vetor experimentalmente para o filarídeo em Pernambuco. Os presentes dados reforçam o papel dessa espécie como vetor de *D. immitis* em uma área onde uma maior importância tem sido dada para *S. (S.) aegypti*.

Neste estudo, observou-se que o *S. (S.) albopicta* além de obter a maior frequência, demonstrou-se estar presente durante todo o ano. Além do mais, foi a única espécie coletada nas larvitampas. Essa observação pode estar relacionada ao fato da coleta ter sido realizada no ambiente peridomiciliar, ambiente este eleito como habitat para a espécie. Esses dados coincidem com aqueles relatados por Silva et al. (2014) que relatam predominância de larvas de *S. (S.) albopicta* na Cidade de Cabo de Santo Agostinho estado de Pernambuco, sugerindo que assim como em Pernambuco, na cidade de João Pessoa a população humana e as populações de animais que vivem nessas áreas estudadas, estão expostos a culicídeos e agentes de transmissão ao longo do ano.

No entanto, culicídeos como o *O. (O.) scapularis* e *Mansonia spp*, já identificados como vetores da *D. immitis* no Brasil também foram observados nesse estudo, porém em menor frequência quando comparado ao *S. (S.) albopicta*, alcançando um total de 58 espécimes. Embora o *O (O.). scapularis*, tenha sido capturado na Região Nordeste, tanto em Maceió, quanto em São Luiz, nenhum indivíduo encontrava-se infectado (AHID; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999). Já no que se diz respeito a região Sudeste do Brasil, este é considerado o vetor primário de *D. immitis* na região oceânica de Niteroi, Estado do Rio de Janeiro (LABARTHE et al., 1998).

É importante ressaltar que as espécies *O. (O.) scapularis* e *S.(S.) albopicta* foram encontradas no peridomicílio, local onde o cão infectado usado como isca residia. Portanto, qualquer uma dessas duas espécies consideradas, pode ter realizado a transmissão, visto já serem vetores conhecidos de *D. immitis*.

O presente estudo constitui na primeira contribuição para o conhecimento da culicidofauna de João Pessoa, bem como, dos vetores potenciais da *D. immitis* em condições naturais, na Região Litorânea da Paraíba.

Investigações sobre a presença de *D. immitis* em *S.(S.) albopicta* deve ser avaliada por PCR e seqüenciamento, para que esse seja realmente confirmado como vetor natural na Paraíba.

5.7 Referências Bibliográficas:

Ahid SM, Vasconcelos PSS, Oliveira RL. Competência Vetorial de *Culex quinquefasciatus* (Say) de diferentes regiões do Brasil para *Dirofilaria immitis*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 2000; 95: 746-775.

Ahid SMM, Lourenço - de - Oliveira R. Mosquitos vetores potenciais de dirofilariose canina na Região Nordeste do Brasil. *Revista Saúde pública* 1999; 33(6).

Brito AC, Vila-Nova MC, Rocha DAM, Costa LG, Almeida WAP, Viana LS et al. Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 2001;17:1497-1504.

Brito AC, Fontes G, Rocha EMM, Rocha DAM, Regis L. Development of *Dirofilaria immitis* (Leidy) in *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) from Maceió, Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94: 575-576.

Cancrini G, Regalbono AF, Ricci I, Tessarin C, Gabrielli S, Pietrobelli M. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vetererinary Parasitology* 2003; 118(3-4): 195-202.

Carvalho GA, Alves LC, Maia RT, Andrade CFS, Ramos RAN, Faustino MAG Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 exposed to different densities of microfilariae of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) *Revista Brasileira de Entomologia* 2008; 52(4): 658-662.

Carvalho GA, Maia RT, Ramos RAN, Andrade CFS, Faustino MAG, Alves LC. Evaluation of Larval Development of *Dirofilaria immitis* in Different Populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Journal of Veterinary Medicine* 2013; 3: 277-281.

Consoli RAGB, Lourenço de Oliveira R. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994.

Labarthe N, Serrão ML, Melo YF, Oliveira SJ, Lourenço-Oliveira R. Potential vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, oceanic region of Niterói municipality, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 1998; 93(4): 425-432 .

Loftin KM, Byford RL, Loftin MJ, Craig ME. Potential mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in Bernalillo country New Mexico. *Journal American Mosquitos Control Association* 1995; 7: 30-36.

Ludlam KW, Jaschowski LA, Otto GF. Potential vectors of *Dirofilaria immitis*. *Journal American Veterinary Medical Association* 1970; 157: 1354-1359.

Serrão MLC, Competência vetorial de *Aedes albopictus* (Skuse,1894), proveniente do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, para *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) Railliet & Henry 1911 [Tese]. Seropédica: Universidade Federal Rural Rio de Janeiro; 2004.

Silva CM, Sérgio H S, Ramos RAN, Faustino MAM G, Alves LC, Carvalho GA. Occurrence of immature forms of culicids (Insecta: Diptera) in the northeastern region of Brazil. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária* 2014; 23(2): 200-205.

Sulaiman S, Jeffery J. The Ecology of *Aedes albopictus* (Skuse) Diptera: Culicidae in a rubber estate in Malaysia. *Entomology Research* 1986; 76: 553-557.

Tesh EK. *Culex tritaeniorhynchus* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) as Natural Vectors of *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Filariidae) in Miki City, Japan. *Journal of Medical Entomology* 1989; 26(4) 294-300.

CAPÍTULO III

6. Uso Da Associação De Ivermectina Com Doxiciclina No Tratamento De Dirofilariose Canina Em Cão Naturalmente Infectado Por *Dirofilaria Immits* – Relato De Caso.

O presente foi submetido ao periódico Revista Acta Scientiae Veterinariaea

6. Uso Da Associação De Ivermectina Com Doxiciclina No Tratamento De Dirofilariose Canina Em Cão Naturalmente Infectado Por *Dirofilaria Immits* – Relato De Caso

Ivana Fernandes VIDAL- MV. MSc., Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Campus de Patos. E-mail: ivanafv@yahoo.com.br

Almir Pereira de SOUZA – MV. Prof. Dr. do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Campus de Patos. E-mail: almir@cstr.ufcg.edu.br

6.1 ABSTRACT: Melarsomine dihydrochloride is the only drug approved in the United States that is considered effective to treat canine adult heartworm. Its use, however, is often followed by severe pulmonary thromboembolism. Drugs such as tetracycline are known to destroy intracellular bacteria of the genus *Wolbachia* present in these Filariidae and indispensable to their development. This fact has opened a promising chapter for controlling this disease. This study aims to describe the effects of treating the disease with 50 mcg/kg/SID ivermectin associated with 10 mg/kg/BID doxycycline for 30 days. The drugs were used isolated in alternating months for a period of 18 months. A mongrel male dog naturally infected with *Dirofilaria immits* was identified in João Pessoa, by performing haematological, biochemical analysis, cardiac biomarkers, imaging (radiography, electrocardiography, echocardiography and CT), serology (ELISA) and parasitological (Knott) tests, as well. After the first thirty days into the treatment with ivermectin, the animal did not present microfilaremia, and remained so for 18 months. This protocol was faster to eliminate microfilaremia compared to others used previously. The blood counts, liver and kidney enzymes and electrocardiogram revealed no systemic changes throughout the period of the study. Serum CK-MB enzyme was high in both periods, while cTnI was within the standard range throughout the study period, which shows lung injury but healthy cardiomyocyte. Radiographic examination of the chest before and after 9 months of treatment showed a slight increase of the cardiac silhouette, about 10.7 cm by the cardiac measurement HSV method. Doppler echocardiography showed systolic pressure of the pulmonary artery at approximately 13.47 mmHg, and no pulmonary hypertension. The mitral and tricuspid heart valves were thickened and insufficient. The right ventricle and atrium were slightly increased. CT

results were within the normal range nine months into the treatment, but at eighteen months showed diffuse lung fields with increasing degree of radiographic attenuation and diffuse interstitial pattern, which probably occurred as a reaction after the death of some worms. Eighteen months after starting the treatment, ELISA test was still slightly reactive, further indicating the presence of antigens. This result suggests two hypotheses: first, it is possible that the adult parasite died due to the higher dose used, but since the animal can remain reactive for antigen tests for up to four months, the dog had not done the seroconversion yet. Secondly, the possibility that adult worms are still present and were not affected by the treatment cannot be ruled out. From the results, it can be suggested that even longer period of treatment and evaluation is needed to determine the true efficacy of such drugs and the time when the animals become negative. The dog of this study continues to be treated under this protocol, however, it is suggested that more advanced searches using antigen levels dosage techniques can be used in this and other protocols, for efficacy and certainty regarding the optimal treatment length period.

KEY WORDS: Therapeutic, Heartworm, dogs, bacteria.

6.2 INTRODUÇÃO

A *Dirofilaria immitis* (*D. immitis*) é um parasita que habita a artéria pulmonar e o ventrículo direito de cães e assim como outros indivíduos desta família, a *D. immitis* alberga bactérias intracelulares do gênero *Wolbachia pipientis* em seu interior, com as quais estabelece uma relação de simbiose. A presença de *wolbachia* na *D. immitis* é necessária para o seu crescimento, desenvolvimento, fertilidade e sobrevivência [8,9, 11].

Para o tratamento da dirofilariose canina existe apenas um fármaco aprovado para o tratamento adulticida eficaz, o dicloridrato de melarsomine. No entanto, existe ainda a necessidade de um tratamento efetivo para infecções adulticidas por filarídeos tanto em humanos como em animais [2], já que o uso do melarsomine é frequentemente, seguido por tromboembolismo pulmonar grave.

Sabe-se que as tetraciclina são conhecidas por destruir bactérias intracelulares do gênero *Wolbachia*. Recentemente, a terapia com doxiciclina foi demonstrada ser macrofilaricida tanto contra infecções em humanos por *Wuchereria bancrofti* [5] e *Onchocerca volvulus*, [7] como em animais por *Onchocerca ochengi* [6]. Essas descobertas abriram um novo capítulo promissor para o controle da infecção, com base na hipótese de que a bactéria *Wolbachia*, representa o alvo adequado a ser atingido [2].

Desta forma, objetivou-se com este estudo descrever os efeitos do protocolo de tratamento constituído pela associação de ivermectina na dose de 50 µg/kg/dia por 30 dias seguidos de 10mg/kg de doxiciclina duas vezes ao dia, 30 dias, alternando-se os meses.

6.3 RELATO DO CASO

Um cão sem raça definida, macho, de sete anos de idade, pêlo longo e 12 kg, foi identificado como portador de *D. immitis* durante um estudo epidemiológico na Praia da Penha no Município de João Pessoa, Paraíba.

O animal foi submetido a um detalhado exame físico onde observou-se na auscultação, a presença de sopro cardíaco de grau II em tricúspide, sem qualquer outra alteração nos demais sistemas. Após confirmação do diagnóstico de dirofilariose canina, realizada pelo teste ELISA através do Snap®4Dx® e pela técnica de Knott, o animal foi submetido ao tratamento, onde o protocolo adotado foi constituído por 50 µg/kg/SID de ivermectina por 30 dias (dose microfilaricida), seguido de 10mg/kg/BID de doxiciclina por 30 dias, alternando-se a droga a cada mês até obtenção de resultado negativo. O animal foi avaliado, através da realização de hemograma, das análises bioquímicas (ureia, creatinina, Alanino-aminotransferase, creatinoquinase-CK, fosfatase alcalina-FA), análise de biomarcadores cardíacos: Troponina I (cTnI) e creatinoquinase – izoenzima fração MB (CK-MB). Para tanto, coletou-se 10mL de sangue da veia cefálica sendo as análises realizadas imediatamente. Exames de imagem como a radiografia torácica, eletrocardiograma, ecodopllercardiograma foram realizados antes do tratamento e após cinco e dez meses após o seu início. A tomografia computadorizada foi realizada aos nove e dezoito meses após o início do tratamento, para pesquisa de eventual tromboembolismo. O método de Knott e o teste Elisa, para pesquisa de microfilárias e antígenos de *D. immitis*, respectivamente, foram realizados mensalmente.

6.4 DISCUSSÃO:

Foi relatado pelo proprietário que o cão não apresentava quaisquer sinais clínicos, no entanto, o mesmo obteve resultado positivo no exame direto, pela técnica de Knott para pesquisa de microfilárias e mostrou-se reagente para *D. immitis* na pesquisa de antígenos pelo teste ELISA. Aos trinta dias iniciais do tratamento com ivermectina, o animal se tornou amicrofilarêmico. Esse protocolo demonstrou ser mais rápido para produzir a amicrofilaremia que outros utilizados anteriormente [11], em que empregou-se 6mcg/kg semanalmente associado a doxiciclina nas semanas de 1 – 6; 10 – 11; 16 - 17; 22 – 25; 28 – 33, conferindo ausência de microfilárias após nove semanas de tratamento. Em outra

avaliação as microfilárias desapareceram do sangue periférico de um cão após 30 dias e após 7 meses em outro animal, que fizeram uso de 272 mg de ivermectina e 652 mg de pamoato de pirantel mensalmente [14].

A avaliação do hemograma, das enzimas hepáticas e renais não revelaram quaisquer alterações sistêmicas durante todo o período desse estudo (Tab. 1). Esses resultados diferem daqueles relatados na literatura [14], onde observou-se elevações transitórias nos níveis de FA e CK, após o início de administração mensal de 272 mg de ivermectina e 652 mg de pamoato de pirantel.

A dosagem sérica do marcador cardíaco CK-MB, revelou-se acentuadamente elevada no período que antecedeu o tratamento, mostrando-se dentro dos valores normais cinco meses após seu início e obtendo-se um marcante aumento aos 10 meses de tratamento. De acordo com a literatura a CK-MB é considerada um padrão ouro no diagnóstico da lesão miocárdica [12], porém, não se pode ignorar o fato dela estar presente em outros órgãos como os pulmões, o que reduz sua especificidade como marcador cardíaco. Embora seu aumento já tenha sido relatado na literatura em cães com comprometimento miocárdico secundário a dirofilariose [12], deve-se considerar que a dirofilariose é uma doença primariamente dos pulmões, órgão este, onde a enzima se faz presente. Portanto, nesse caso, sua elevação pode se dar não só pelo dano cardíaco, mas também pulmonar.

A dosagem sérica da cTnI apresentou-se dentro dos valores de referência estabelecidos durante todo o tratamento. A cTnI é um marcador sanguíneo altamente sensível e específico para o diagnóstico não invasivo do aumento da permeabilidade do cardiomiócito e sua liberação na circulação parece estar relacionada a áreas de necrose de cardiomiócitos de forma irreversível [1, 4, 13,16].

Como a cTnI é considerada específica do miocárdio e a CK-MB pode ser observada no miocárdio mas também nos pulmões, órgão mais envolvido nesta parasitose. Acredita-se que a elevação dos níveis séricos da mesma possam estar envolvidos com micro lesões neste órgão, secundária a agressão do parasito e da sua morte, visto que a cTnI não obteve alterações, sendo esta última mais confiável para identificação ao dano miocárdico.

No exame radiográfico do tórax antes e após 9 meses de tratamento, observou-se lobos pulmonares com opacidade intersticial preservada em ambos os hemitórax, não sendo evidenciado afecção respiratória; a traquéia encontrava-se em sua topografia habitual, sem sinais radiográficos de compressão atrial na imagem. A silhueta cardíaca

apresentou um aumento discreto, com a mensuração cardíaca pelo método vertebral Scala Heart (VHS) de 10,7 cm (Fig.2) observando-se discreto aumento. A artéria aorta e veia cava apresentaram espessura fisiológica e os vasos coronários preservados.

O exame ecodopplercardiograma e o mapeamento de fluxo em cores foi feito pelo MODO-B (bidimensional) e MODO-M (unidimensional). No início do tratamento, observou-se insuficiência da valva pulmonar e a pressão sistólica na artéria pulmonar foi estimada em aproximadamente 13,47 mmHg, não havendo hipertensão pulmonar antes nem durante o tratamento, o que difere do observado na literatura, que afirma que a dirofilariose se caracteriza por uma proliferação endotelial e inflamação perivascular seguida de tromboembolia, todos estes fatores conduzindo à uma hipertensão pulmonar crônica [4, 15]. Tal fato pode estar associado a uma baixa carga parasitária no paciente deste estudo.

Não foram visualizados vermes adultos nesta avaliação no período que antecedeu nem durante o tratamento, sugerindo-se que o animal em questão apresentava uma baixa carga parasitária. Sabe-se que a presença de vermes adultos no coração direito é mais comum a necropsia que em cães vivos, por causa da diminuição da pressão que ocorre a medida que o sangue para de fluir nas artérias pulmonares [3].

No exame tomográfico do toráx realizado após nove meses de tratamento, observou-se campos pulmonares com grau de atenuação radiográfica preservado e aspecto normal, bem como ausência de sinais de tromboembolismo pulmonar no estudo contrastado em fase arterial e venosa. Não evidenciou-se lesões nodulares no parênquima, nem infiltrado intersticial ou alveolar. Brônquios de aspecto preservado com conteúdo gasoso. Ausência de nível hidroaéreo e linfonodos esternais e traqueobrônquicos normais. Dimensões preservadas e impregnação normal de contraste iodado. Ausência de nódulos subpleurais, sem evidência ao momento do exame de acúmulo de líquido em espaço pleural. Nesse estudo, nenhuma lesão digna de nota foi observada, apesar de ter sido realizado em período tardio de tratamento.

Acredita-se que neste exato momento do exame, as lesões não foram observadas, pois seu aparecimento e desaparecimento ocorrem naturalmente. Estes achados concordam com aqueles descritos previamente na literatura [14], onde utilizou-se uma dose inferior de ivermectina (6 mcg/kg semanalmente), observando-se dilatação periférica da artéria pulmonar após um mês da administração, sugerindo embolia pulmonar além de pneumonia. No entanto, estes resultados melhoraram ao longo do tempo [14]. Segundo relatos da literatura, o aparecimento e desaparecimento das lesões

são observadas em todos os lóbulos durante o período de administração do fármaco, no entanto, os sintomas clínicos de embolia pulmonar, não são reconhecidos [14].

Após um ano e seis meses de tratamento, o animal permanece sem microfilárias no sangue circulante, porém na realização do teste Elisa o animal apresentou ainda a presença de antígenos de *D. immitis*, embora a visualização da reação sorológica tenha se mostrado mais discreta (Fig. 1).

Na ecodopllercardiografia (Fig.4), também realizada após um ano e seis meses, observou-se câmaras cardíacas com dimensões discretamente aumentadas (átrio esquerdo e direito). A função sistólica dentro dos valores de normalidade e a diastólica preservada no momento do exame. Ausência de visualização de parasitos adultos de *D. immitis* ao momento do exame.

Nesse mesmo período a tomografia computadorizada (Fig.6) demonstrou campos pulmonares com aumento difuso do grau de atenuação radiográfica com padrão intersticial difuso, o que provavelmente ocorreu como reação após a morte de alguns vermes. Estudos anteriores revelam que as lesões são observadas no tecido pulmonar em torno dos vasos, sendo que em sua maioria são transitórias e desapareceram antes da ocorrência de lesões como a dilatação localizada nas artérias pulmonares periféricas [14].

O calibre dos vasos pulmonares estavam normais, não sendo identificadas lesões nodulares no parênquima pulmonar. Não foram observadas imagens compatíveis com granulomas eosinofílicos decorrentes de infecção por *D. immitis*. Avaliação da silhueta cardíaca demonstrou padrão de aumento em região correspondente à câmaras ventricular e atrial direita (Fig. 6).

A partir destes resultados duas hipóteses podem ser sugeridas, a primeira é que existe a possibilidade de que o parasita adulto tenha morrido, já que este protocolo adotou uma dose maior que os realizados anteriormente e alterações no teste ELISA e na tomografia foram observadas durante esse tempo da pesquisa, porém, como o animal pode permanecer reagente aos testes de antígeno por até 4 meses, este animal ainda não tenha tido tempo suficiente de eliminar todos os antígenos decorrentes da morte do parasito, logo não houve a soro-conversão. A segunda hipótese é que existe a possibilidade da existência de vermes adultos presentes e ainda não afetados com esse período de tratamento. Foi relatado anteriormente que o efeito adulticida da ivermectina requer mais de um ano de administrações mensais contínuas, podendo levar mais de dois anos para eliminar todos os parasitas. Quanto mais velhos forem os helmintos no momento do primeiro contato com a ivermectina, mais resistentes serão e mais lentamente

se dará a morte de todos [10]. Foi observado em estudos recentes que a administração mensal da ivermectina a longo prazo tem sim propriedades adulticidas, no entanto, a completa eliminação dos parasitas adultos pode se estender até 36 meses [2, 17]

Conclui-se que o tratamento adotado mostra-se seguro já que o animal avaliado demonstrou evidência pulmonar de morte de parasitas, sem apresentar qualquer sintoma de tromboembolismo. No entanto, um maior período de administração se faz necessário, para que o mesmo elimine todos os antígenos. O animal avaliado nesse estudo persiste com o protocolo adotado em questão, todavia, sugere-se que pesquisas mais avançadas utilizando-se técnicas de dosagens de níveis de antígeno possam ser usadas nesses e em outros protocolos, para certeza do protocolo ideal.

Tabela 1. Valores da bioquímica sérica e marcadores cardíacos de um cão portador de *Dirofilaria immitis*, antes e durante o tratamento com a associação 10mg/kg de doxiciclina e 50 mcg/kg de ivermectina.

MARCADORES	Antes	5 meses	10 meses	Referência
Troponina I	< 0,060ng/mL	< 0,060ng/mL	0,01 ng/mL	< 0,060ng/mL
CK-MB	159 U/L	0,42ng/mL	342 U/L	7 a 25 U/L ou < 5ng/mL
Creatinina	0,7 mg/dL	1,0 mg/Dl	0,8mg/Dl	0,6–1,6 mg/dL
Fosfatase alcalina	19 U/L	38 U/L	24 U/L	20-150 U/L
Transaminase pirúvica	32UI/L	28 UI/L	44UI/L	10–88 UI/L
Ureia	33mg/Dl	41mg/dL	45 mg/dL	10-25mg/dL
Creatinofosfoquinase	92 U/L	74U/L	-	20- 200U/L

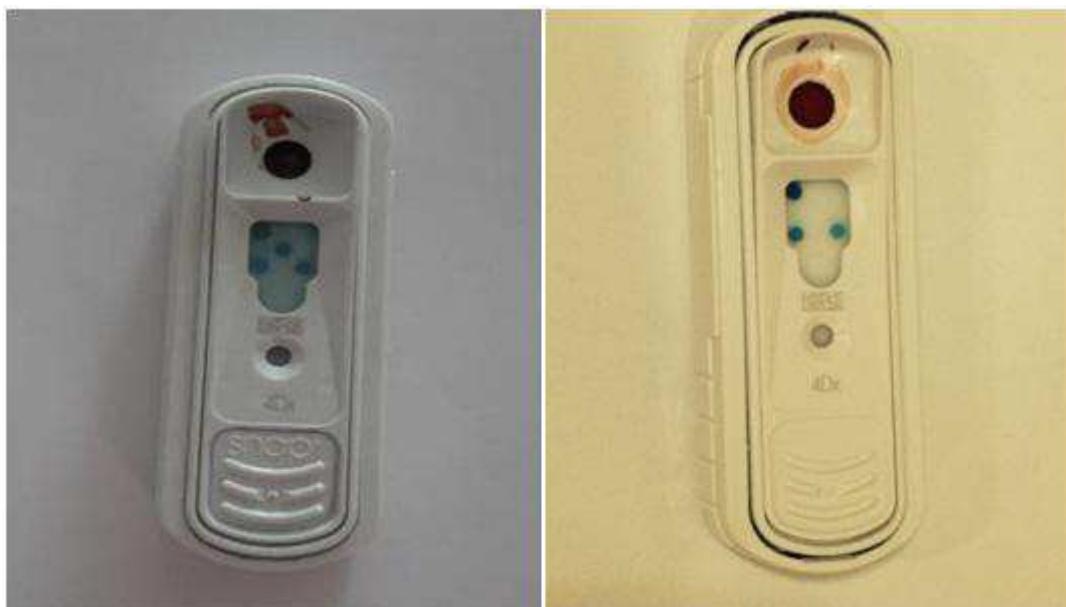


Figura 1. A: Teste ELISA de um cão portador de *Dirofilaria immitis* realizado antes do tratamento. B. Teste ELISA após dezoito meses do início do mesmo. Observar que após o tratamento o animal reagiu de forma mais discreta.

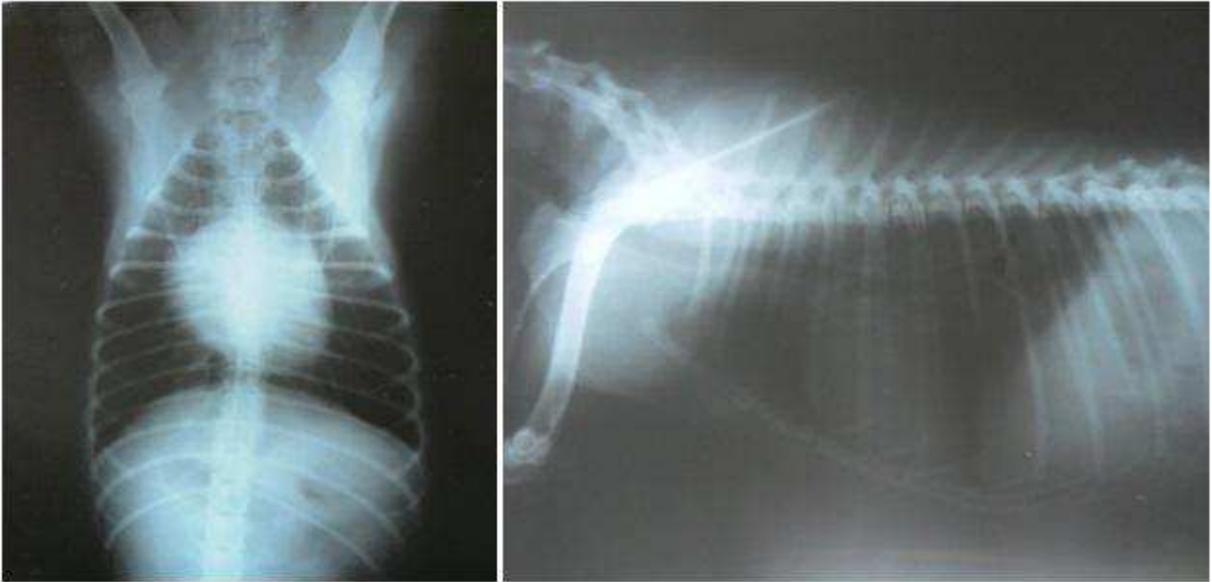


Figura 2. Radiografia nas posições ventro-dorsal e latero-lateral de um cão portador de *Dirofilaria immitis*, assintomático, naturalmente infectado mostrando ausência de alterações pulmonares e discreto aumento da silhueta cardíaca.

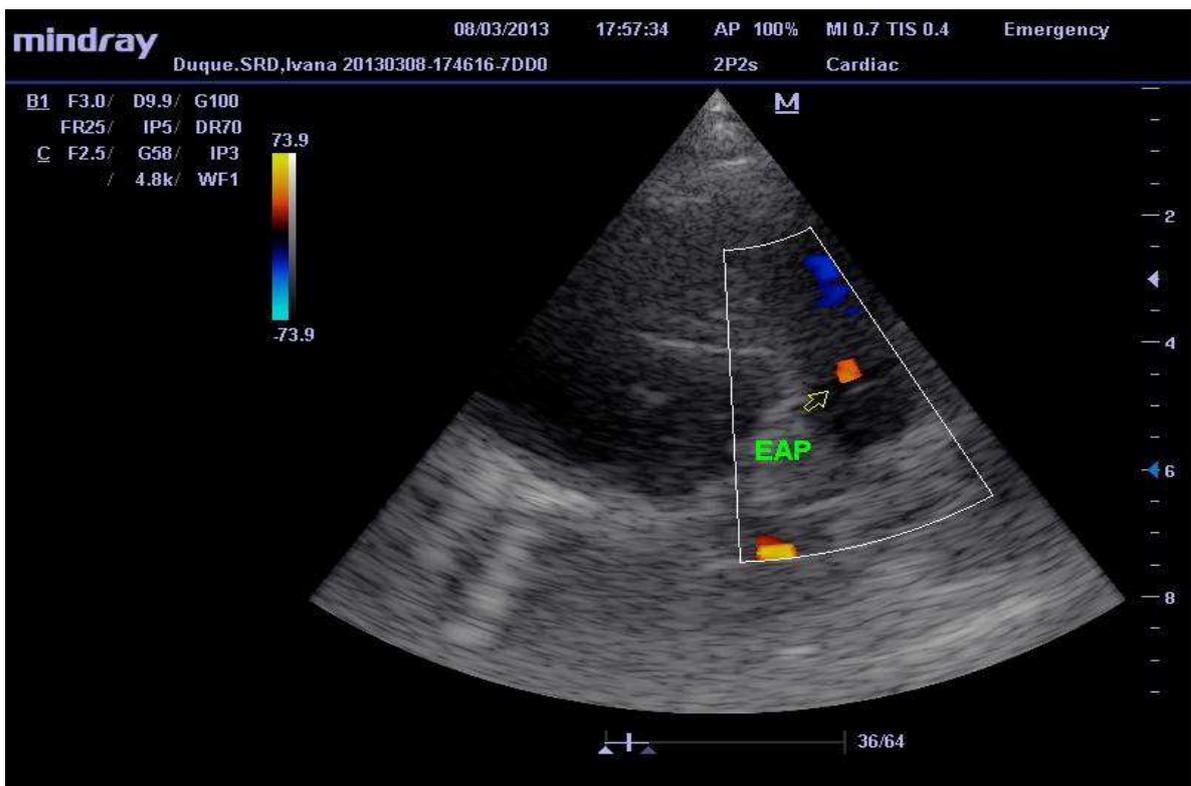


Figura 3. Ecodopplercardiograma de um cão portador de *D. immitis*, assintomático, naturalmente infectado mostrando insuficiência valvar pulmonar, antes do início do tratamento.

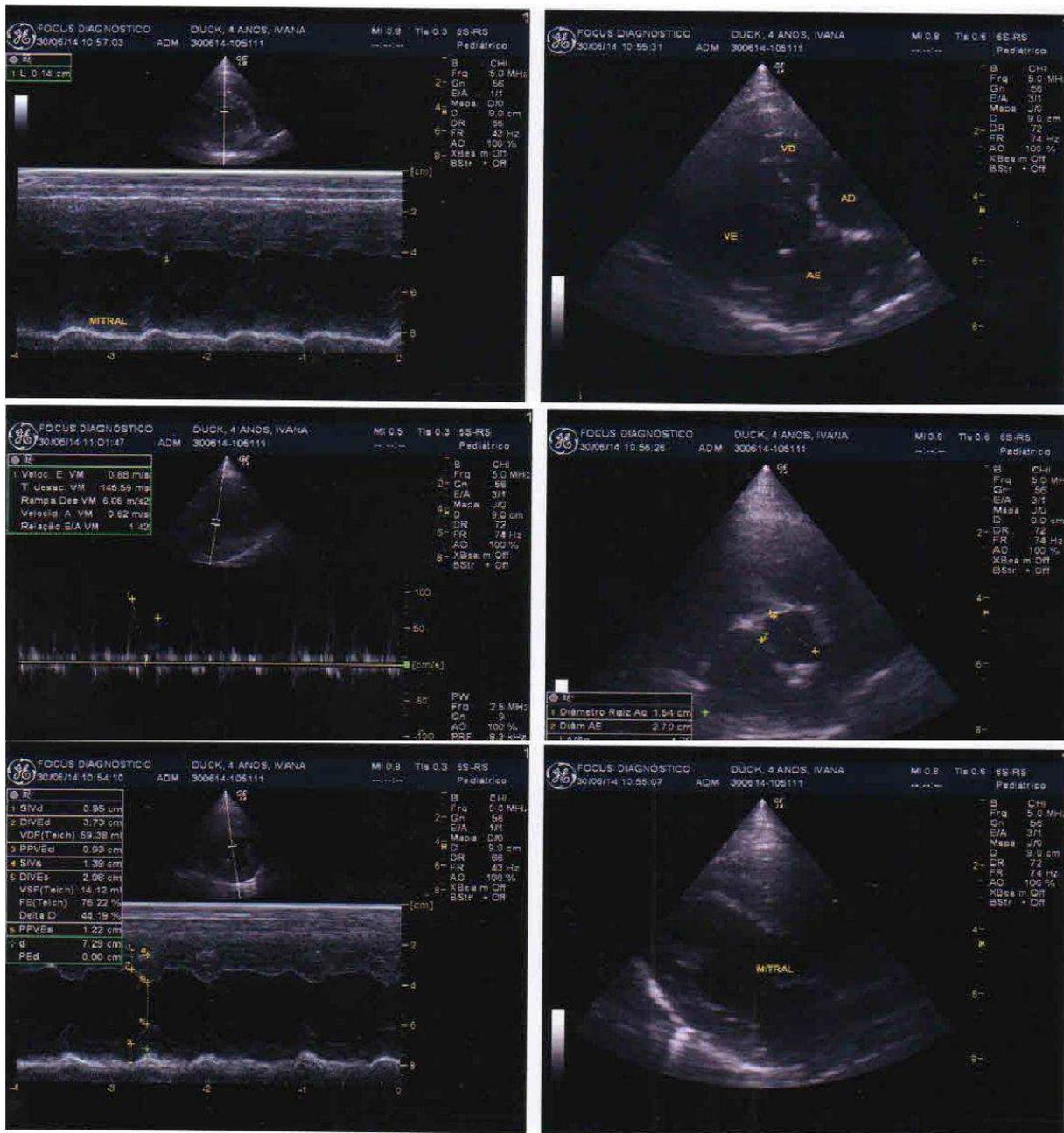


Figura 4. Ecodopplercardiograma de um cão portador de *Dirofilaria immitis*, assintomático, naturalmente infectado mostrando tamanho das câmaras cardíacas, após 18 meses do início do tratamento.

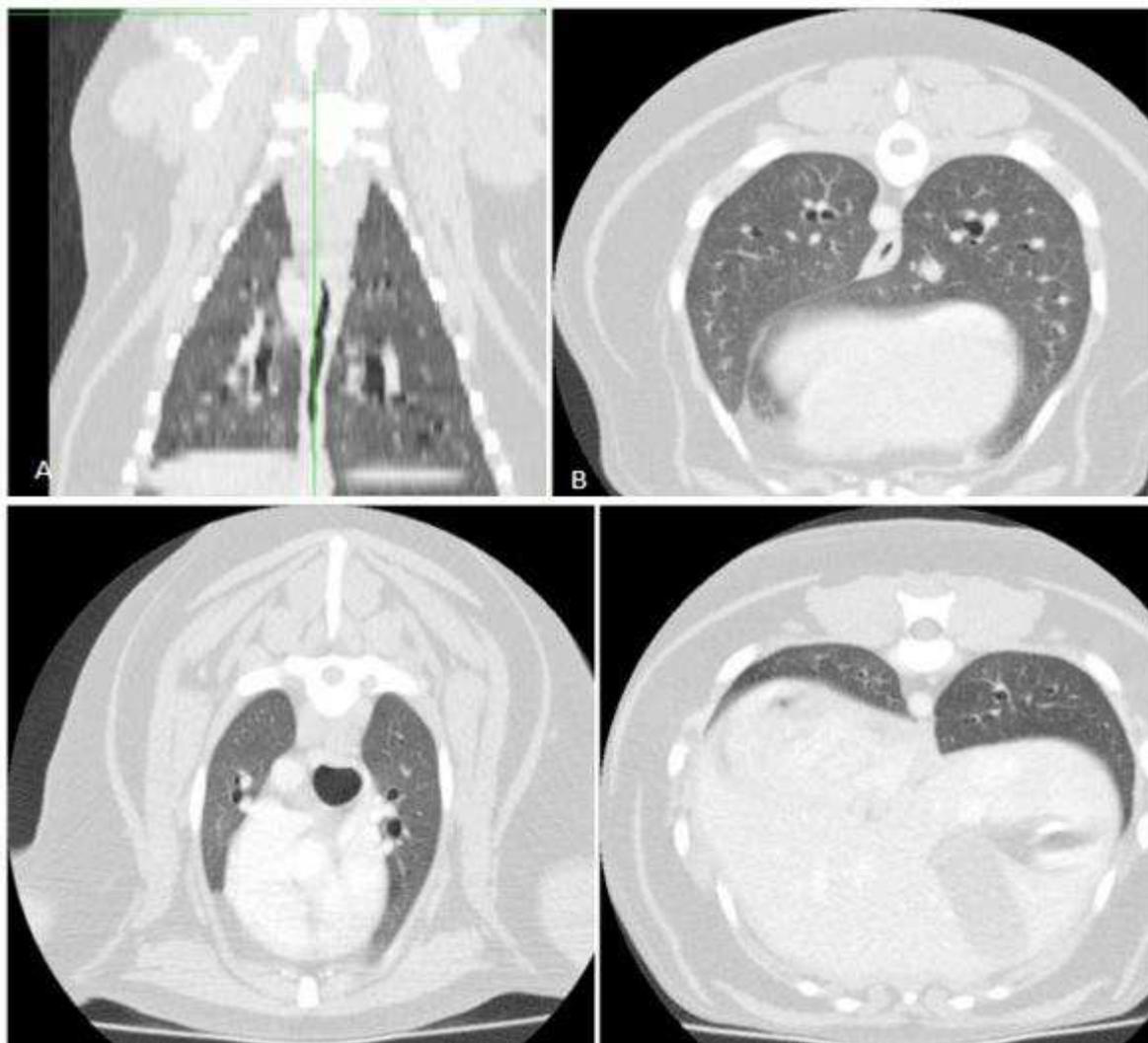
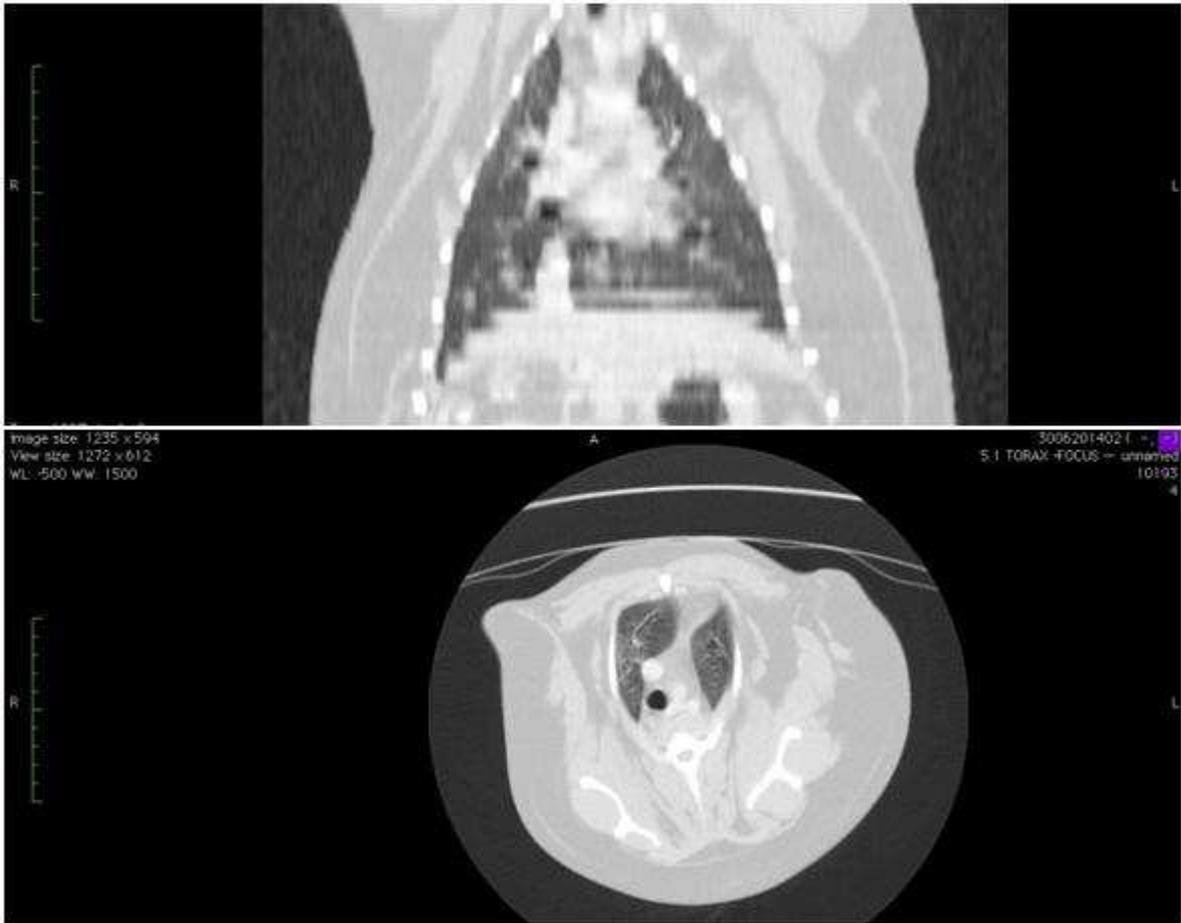
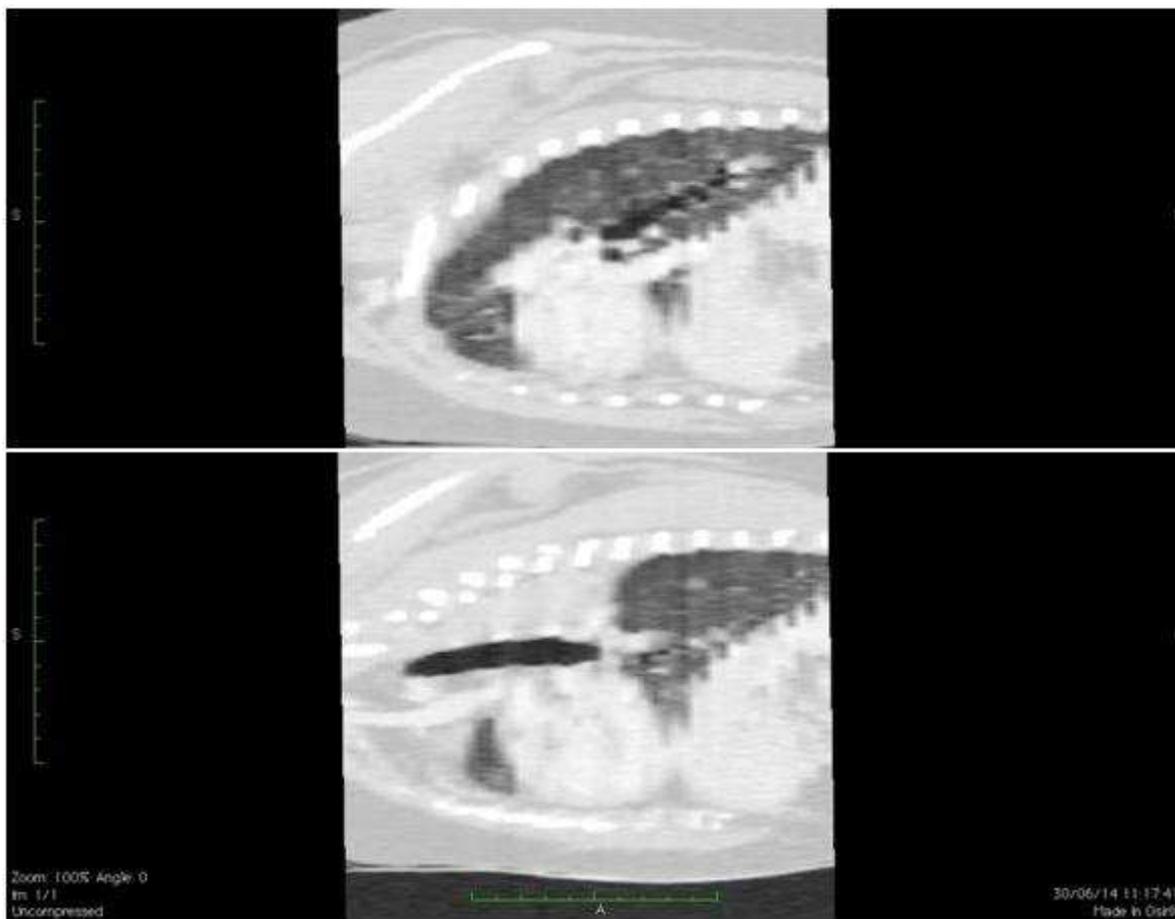


Figura 5. Imagens tomográficas de tórax de um cão portador de *D. immitis* assintomático, nove meses após o início do tratamento, mostrando ausência de tromboembolismo pulmonar.





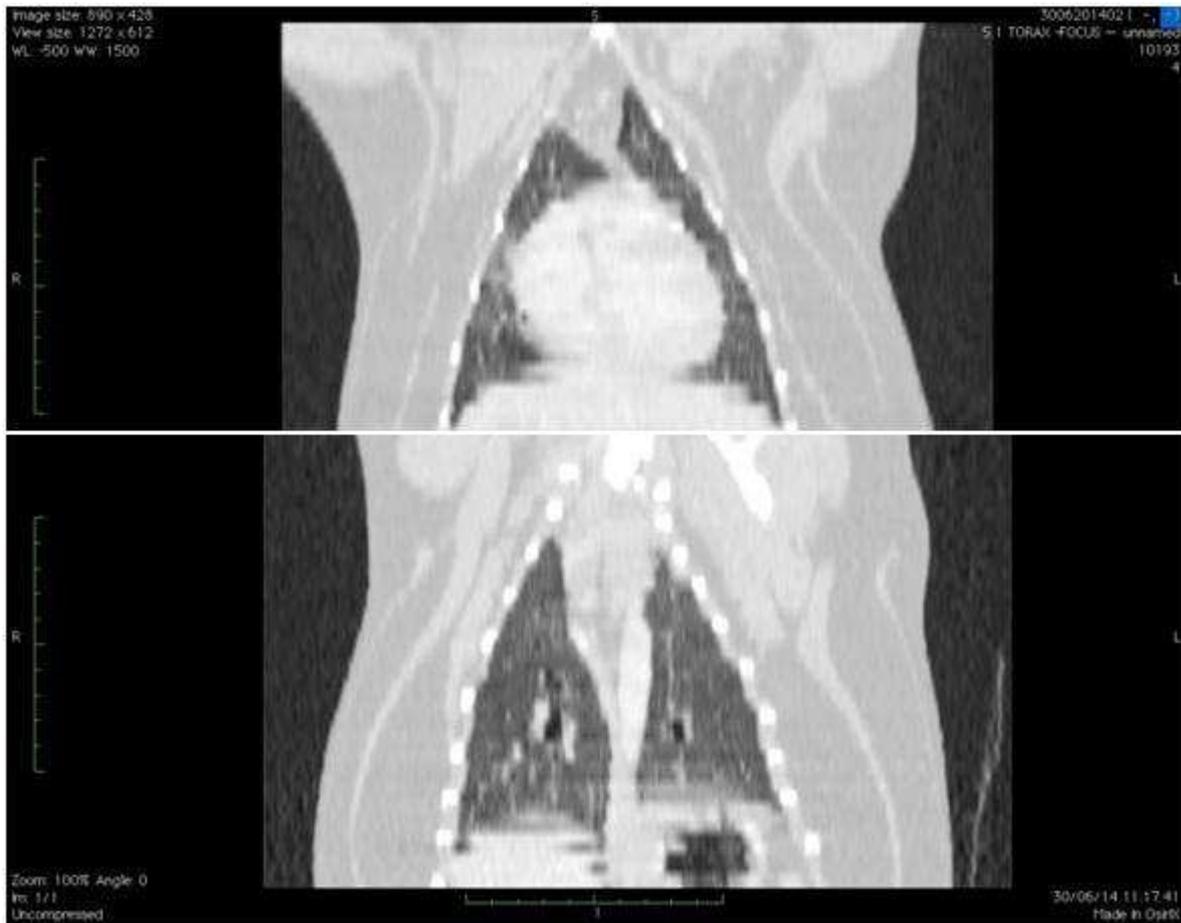


Figura 6. Imagens tomográficas de tórax de um cão portador de *D. immitis* assintomático, dezoito meses após o início de tratamento, evidenciando campos pulmonares com aumento difuso do grau de atenuação radiográfica com padrão intersticial difuso.

Esse estudo é parte integrante do protocolo licenciado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) UFCG sob o número 177/2014.

6.5 SOURCES AND MANUFACTURERS:

¹IDEXX Laboratories, USA.

6.6 REFERÊNCIAS:

- 1 - **Adams J.E., Apple F. & Jaffe A.S. 2007.** Markers in cardiology: A case-oriented approach. 1 ed. Massachusetts: Blackwell Publishing Futura, pp. 261.
- 2 - **Bazzocchi C., Mortarino M., Grandi G, Kramer L.H., Genchi C., Bandi C., Genchi M., Sacchi L. & Mc Call J.W. 2008.** Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *International Journal For Parasitology*. 38: 1401-1410.
- 3- **Bowman D.D. 2006.** Parasitologia Veterinária de Georgis, 8. ed. Barueri- SP: Manole, pp.216-222.
- 4 - **Carretón E., Grandi G., Morchón R., F. Simón F., Passeri B., Cantoni A.M., Kramer L. & Montoya-Alonso. 2012** Myocardial damage in dogs affected by heartworm disease (*Dirofilaria immitis*): Immunohistochemical study of cardiac myoglobin and troponin I in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. 189: 390–393.
- 5 - **Debrah A.Y., Mand S., Marfo-Debrekyei Y., Batsa L., Pfarr K., Buttner M., Adjei O., Buttner D. & Hoerauf A. 2007.** Macrophilicidal effect of 4 weeks of treatment with doxycycline on *Wuchereria bancrofti*. *Tropical Medicine International Health*. 12: 1433–1441.
- 6 - **Gilbert J., Nfon C.K., Makepeace B.L., Njongmeta L.M., Hastings I.M., Pfarr K.M., Renz A., Tanya V.N. & Trees A.J. 2005.** Antibiotic chemotherapy of onchocerciasis: in a bovine model, killing of adult parasites requires a sustained depletion of endosymbiotic bacteria (*Wolbachia* species). *Journal. Infectious Disease*. 192: 1483–1493.
- 7 - **Hoerauf A., Specht S., Buttner M., Pfarr K., Mand S., Fimmers R., Marfo-Debrekyei Y., Konadu P., Debrah A.Y., Bandi C., Brattig N., Albers A., Larbi J., Batsa L., Adjei O., Buttner D.W. 2007.** *Wolbachia* endobacteria depletion by doxycycline as antifilarial therapy has microfilaricidal activity in onchocerciasis: a randomized placebo-controlled study. *Med. Microbiology Immunology*. 197(3): 295–311.

- 8 - **Langworthy N.G., Renz A., Mackenstedt U., Henkle-Du hrsen K. Bronsvort M.B.C. , Tanya V.N. &Donnelly M.J. & Trees A.J. 2000.** Macrofilaricidal activity of tetracycline against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*: elimination of *Wolbachia* precedes worm death and suggests a dependent relationship. *The Royal society. Proceedings Royal Society London*. B. 267:1063-1069.
- 9 - **Mc Call J.W., Jun J.J. & Bandi C. 1999.** *Wolbachia* and the antifilarial properties of tetracycline. An untold story. *Italian Journal. Zoology*. 55:7-10.
- 10 - **McCall J.W., Guerrero J., Genchi C., Kramer L., Bazzocchi C., Simon F., Martarino M. & Soc A.H. 2004** Recent advances in heartworm disease. *Veterinary Parasitology*.125:105-130.
- 11 - **Mc Call J.W., Genchi C., Kramer L., Guerreo J., Dzimianski M.T., Supakorndej P., Mansour A.M., Mc Call S.D., Supakorndej N., Grandi G. & Carson B. 2008.** Heartworm and wolbachia: Therapeutic implications. *Veterinary Parasitology*. 158: 204- 214.
- 12 - **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 desnível (infra e supra) do segmento ST, utilizando ensaio imunométrico por quimioluminescência. 61p. São Paulo, SP. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo.
- 13 - **Shaw S.P., Rozanski E.A. & Rush J.E. 2004.** Cardiac troponins I and T in dogs with pericardial effusion. *Journal of veterinary Internal Medicine*. 18: 322-324.
- 14 - **Takahashi A., Yamada K., Kishimoto M., Shimizu J. & Maeda R. 2008.** Computed tomography (CT) observation of pulmonary embolia caused by long-term administration of ivermectin in dogs experimentally infected with heartworms. *Veterinary Parasitology*. 155: 242-248.
- 15 - **Vezzani D., Fontanarrosa M.F. & Eiras D.F. 2008.** Are antigen test kits efficient for detecting heartworm-infected dogs at the southern distribution limit of the parasite in South America? Preliminary Results. *Research Veterinary Science*. 85:113-115.
- 16 - **Yonezawa L.A., Silveira V.F., Machado L.P. & Kohayagawa A. 2009.** Marcadores cardíacos na medicina veterinária. *Ciência Rural*. 40(1):1-9.
- 17 - **Youn H., Ra J.C. Kim B.K., Lim Y.S., Kim K.H. & Lee K.E. 2012.** Studies on the anti-parasitic efficacy and safety of ivermectin and pyrantel pamoate compound against *Dirofilaria immitis* in dogs. *korean Journal Veterinary Research*. 52(1): 53-56.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com as análises realizadas, pode-se concluir que a dirofilariose canina existe e é autóctone no litoral Paraibano, porém, pode-se descrever seu índice como relativamente baixo.

Apesar da baixa prevalência para dirofilariose canina observada no litoral da Paraíba, a terapia preventiva para espécie canina deve ser adotada, devido as condições ambientais propícias, a ocorrência de cães positivos e presença local de culídeos já conhecidos como transmissores da doença em outras regiões do mundo.

Com relação ao protocolo utilizado nesse estudo, pode-se julgá-lo como usado por tempo insuficiente, haja vista que o animal permaneceu reagente ao teste ELISA após 18 meses, demonstrando a presença do antígeno. Sugere-se que um período ainda maior de tratamento seja efetuado e que outras doses sejam testadas em busca do protocolo ideal.

8. ANEXOS

8.1 QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO – Nº _____

Dados do proprietário

1 Nome: _____

2-Endereço: _____

3-Bairro: _____ Cidade: _____

4-Telefone: _____ CEP: _____

5 – Grau de escolaridade: () analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto () 2º grau completo () 3º grau incompleto () 3º grau completo

6 – Renda familiar: () menos de 2 salários mínimo () 2 a 4 salários mínimos () 5 a 6 salários mínimos () mais de 6 salários mínimos

II- DADOS DO ANIMAL

7 – Nome: _____ () macho, () Fêmea

8 – Idade: () 6 a 12 meses () 12 – 24 meses () 24 -48 meses () 4 a 6 anos () acima de 6 anos.

9- Raça: () sem raça definida () com raça definida Qual _____

III- MANEJO

11- tipo de criação: () domiciliar () semi-domiciliar () solto

12- alimentação: () Ração comercial Qual? _____ () caseira () ambos

13- Tem contato com outros animais? () sim () não

14- Se sim, com quais? () eqüídeos () silvestres () felinos () cães () suínos

15 – existem outras formas de contato? () Animais em casa () vizinhos tem animais () O seu animal vai a petshop () passeios constantes

16 – qual ambiente onde o animal é criado?

Terra cimento terra/cimento

17- É realizada limpeza ou desinfecção do local? sim não

18 – com que frequência? diária semanal quinzenal mensal

19- O animal tomou alguma vacina? Sim não

20- Se sim, quais? anti – rábica contra viroses

21 - O animal já foi vermifugado? Quando? _____

sim não

22- apresenta carrapatos? _____

23- sinais clínicos: _____

24- uso de ivermectina sim () não()

25- Presença de mosquitos sim () não ()

26- uso de doxiciclina sim() não ()

27- conhecimento sobre a doença sim() não ()

8.2 NORMAS PARA ELABORAÇÃO DA TESE
PPGMV - UFCG
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL CAMPUS DE PATOS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA VETERINÁRIA

NORMA Nº 01/2011

Altera a NORMA Nº 01/09 de 04 de fevereiro de 2009 e acrescenta novos critérios para a elaboração e defesa da dissertação e tese do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da UFCG.

O Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, no uso de suas atribuições, de conformidade com a legislação em vigor, e nos termos da Resolução Nº 13/02 do CONSEPE e do seu Regulamento.

RESOLVE:

Art. 1º Decide modificar a redação do § 1º do art. 2º da norma 01/2009 e estabelece que o aluno deva apresentar, antes da defesa, o comprovante de submissão dos trabalhos da dissertação e tese às revistas Qualis A1, A2, B1 e B2 da CAPES.

§ 1º - O corpo da dissertação será constituído por capítulos, pelo menos dois, e poderão ser da seguinte forma:

I - uma revisão da literatura e um trabalho já enviado a uma revista científica Qualis citadas no Caput do artigo;

II - dois trabalhos enviados à revista Qualis citadas no Caput do artigo.

§ 2º - O corpo da tese poderá ser constituído por:

I - três trabalhos submetidos a revistas científicas Qualis citadas no Caput do artigo;

II - dois trabalhos submetidos a revistas científicas Qualis citadas no Caput do artigo e uma revisão da literatura.

§ 3º Os demais itens relacionados com a elaboração da dissertação deverão seguir as normas no Anexo.

Art. 2º A qualificação do doutorado deverá ser feita em um prazo de 30 (trinta) meses após o ingresso do doutorando no Programa.

Art. 3º A presente Norma entra em vigor a partir da data de sua publicação. Patos, 03 de junho de 2011.

Prof. Dr. Franklin Riet Correa
Coordenador do PPGMV

Anexo

NORMAS PARA ELABORAÇÃO DA DISSERTAÇÃO E TESE

O corpo da dissertação será constituído por capítulos, pelo menos dois: 1- revisão da literatura e 2- um trabalho nas normas da revista científica Qualis A ou B da CAPES o qual será enviado, obedecendo ao prazo máximo de 30 dias após a defesa. Ao invés da revisão de literatura, o aluno poderá apresentar outro artigo científico, na mesma linha de pesquisa. A dissertação constará, dessa forma, de dois artigos científicos, um título que abranja os dois artigos, uma introdução e conclusões relacionadas aos dois artigos. O trabalho será redigido seguindo as normas da revista para a qual será enviado. A revisão da literatura, se não tiver sido enviada para outra revista, deve seguir as mesmas normas que o trabalho a ser enviado, deverá ser incluída versão em inglês e português.

Se a dissertação constar de mais de um trabalho original, estes deverão seguir as normas das respectivas revistas para as quais serão enviados. Em todos os casos, no final da dissertação devem ser incluídas, como anexo, as normas da (s) revista (s) para as quais os trabalhos serão enviados. Para a formação da dissertação, será utilizada a folha A4. O estilo da fonte deve ser Times New Roman, tamanho 12 e espaçamento 1,5 entre as linhas. Na capa será incluído o nome da instituição, abaixo o título, ao lado direito à descrição da dissertação sem constar à área, abaixo o nome do mestrando e por último o nome da cidade, Estado e data.

A contracapa será constituída da mesma forma da capa, acrescentando-lhe apenas o nome do orientador e no verso, a ficha catalográfica.

No caso do aluno optar pela apresentação deverá ser incluída uma introdução com uma explicação dos dois trabalhos.

No final, após o último capítulo deverão ir as conclusões do (s) trabalho (s).

Tanto na apresentação quanto nos diferentes capítulos e conclusões, nos exemplares para a defesa da dissertação deve ser incluído, à direita da folha, a numeração das linhas, exceto na versão final.

O sumário será antes da introdução.

As Figuras, Tabelas ou Quadros devem ser incluídos dentro dos resultados, em folhas separadas, com não mais de 4 Figuras, Quadros ou Tabelas por folha.

Um volume deverá ser entregue à coordenação 45 dias antes da defesa para ser encaminhado a um revisor para avaliação se o mesmo está apto à defesa.

Cinco exemplares da dissertação devem ser entregues à coordenação, no mínimo 30 dias antes da defesa.

Após a defesa o mestrando deverá entregar na coordenação do programa 5 (cinco) exemplares da dissertação, com pelo menos 2 (duas) em capa dura, no prazo previsto no regimento (30 dias após a defesa). Obrigatoriamente deverá constar a ficha catalográfica. Na versão final da dissertação não deve constar o anexo da cópia do trabalho em inglês a ser publicado na revista, mas somente a cópia do trabalho em português. No anexo deverá constar uma folha mencionando o site da revista em que o artigo será publicado. Deverá ser entregue na Coordenação em separado uma cópia do artigo escrito em inglês, com as devidas correções da banca, a ser enviado para publicação.

Agradecimentos e dedicatórias serão optativos.

Entregar uma cópia em CD da dissertação e/ou tese em pdf em um único arquivo. Deverá ser idêntico à versão impressa. Não será aceito a dissertação em mais de um arquivo.

Patos, 03 de junho de 2011.

Prof. Dr. Franklin Riet Correa

Coordenador do PPGMV

8.3 NORMAS DO CAPÍTULO I E II

Instruções aos Autores

Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Apresentação

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária é um órgão oficial de divulgação do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV). Tem como objetivo publicar temas relativos a Helmintos, Protozoários, Artrópodes e Rickettsias bem como assuntos correlatos. A revista tem periodicidade trimestral. São aceitas submissões de manuscritos, em inglês, de pesquisadores de qualquer país, associados ou não ao CBPV. Este periódico oferece a todos os pesquisadores acesso eletrônico livre para consulta de todos os trabalhos, desde seu primeiro volume publicado em 1992.

Política Editorial

Os artigos submetidos à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária deverão caracterizar-se como científicos e originais, essencialmente sobre parasitas de animais em geral. O(s) autor(res) deverá(ão) anexar uma carta, previamente assinada, responsabilizando-se pela originalidade do artigo, salvo resumo(s) apresentado(s) em eventos científicos, não submetidos à publicação em outros periódicos. Trabalhos com mais de uma autoria deverão seguir com uma declaração de concordância de todos os autores, referente à publicação. Trabalhos com número excessivo de autores deverão ser avaliados pelos editores científicos assistentes, em relação ao protocolo experimental. É necessária a colaboração substancial de todos os autores no planejamento do estudo, obtenção, análise e interpretação de resultados, confecção do artigo e aprovação da versão final submetida e aceita. Colaboradores que não tiveram participação ativa em todo o processo descrito acima poderão ser listados na seção de agradecimentos. Poderá haver agradecimento ao pesquisador que forneceu auxílio técnico, correção ou sugestão na escrita, ou ao chefe de departamento que proporcionou infraestrutura para elaboração do trabalho. O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator *ad-hoc*. Nesse processo, o editor-chefe e os editores científicos assistentes poderão sugerir ou solicitar as modificações necessárias, apesar de ser de responsabilidade dos autores os conceitos emitidos. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 3 revisores anônimos, selecionados pelo editor-chefe e editores científicos assistentes. A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária atribui a seus artigos as categorias de: Artigos Completos, Notas

de Pesquisa e Artigos de Revisão, sendo este último escrito por especialistas e condicionado a solicitação por convite do editor-chefe. Revisões não solicitadas não serão aceitas, mas o tópico da revisão pode ser sugerido, previamente, ao editor-chefe ou editores científicos assistentes.

Taxa de tramitação:

Da submissão do artigo, será cobrada uma taxa de R\$ 40,00 (quarenta reais) referente ao processo de tramitação, paga através de depósito bancário: Banco do Brasil/ Agência: 0269-0/ Conta Corrente: 28.848-9 (RBPV). O comprovante de pagamento deve ser anexado junto ao artigo no ato da submissão.

Processo de avaliação pelos pares

O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator *ad-hoc*. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 3 revisores anônimos, selecionados pelo editor-chefe e editores científicos assistentes.

O relator deverá preencher o formulário de avaliação da RBPV, disponível no sistema online de submissão (<http://submission.scielo.br/index.php/rbpv>). Tendo recebido a avaliação de pelo menos 2 dos revisores selecionados, o(s) autor(es) receberá os formulários de avaliação e possíveis correções feitas diretamente no texto. O avaliador poderá corrigir novamente o artigo, se necessário. O artigo a ser submetido deve passar por revisão do inglês, pelos revisores credenciados pela RBPV (http://cbpv.com.br/rbpv/revisoes_traducoes.php). Junto ao trabalho submetido anexar o certificado de revisão de inglês. Os pesquisadores deverão assumir os custos da revisão. Lembramos aos autores, que a RBPV não repassa aos mesmos, os custos de publicação por página dos trabalhos. Não seguindo as exigências do processo de submissão, o trabalho não entrará no processo de avaliação. Após diagramação e editoração, os editores científicos assistentes e a editora-chefe da revista, fazem as correções finais.

Transferência de direitos autorais:

Ao ser submetido, o artigo deve vir acompanhado de um ofício, assinado por todos os autores, concordando com a submissão e, caso aprovado, a publicação do artigo apenas na RBPV.

Ética

Experimentos que utilizam animais deverão ser conduzidos obedecendo às normas aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (<http://www.cobea.org.br>),

devendo os autores apresentarem o número de protocolo de submissão e aprovação dos trabalhos em Comissão de Ética e Bem-Estar Animal.

Apresentação dos Manuscritos

Na elaboração do texto serão observadas as seguintes normas:

Os trabalhos devem ser submetidos em inglês, de forma concisa, com linguagem impessoal e com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos, lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente. Os trabalhos deverão ser apresentados em fonte “Times New Roman”, tamanho 12, com margem superior e inferior de 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaçamento entre linhas de 1,5 cm com as páginas numeradas. Para a categoria Artigo Completo, o trabalho não deverá exceder 15 páginas, quando da diagramação final. Para a categoria Notas de Pesquisa, o trabalho não deverá exceder 5 páginas, quando da diagramação final. As tabelas e ilustrações deverão ser apresentadas separadas do texto e anexadas ao final do trabalho, sem legendas. As respectivas legendas deverão vir no texto logo após as referências bibliográficas. Ao submeter o artigo, anexar o comprovante de depósito, via endereço eletrônico: <http://www.scielo.br/rbpv>. Os trabalhos aceitos deverão ser revisados por um dos revisores de língua inglesa credenciados pela RBPV, de escolha e sob responsabilidade dos autores. Os Artigos Completos devem ser organizados obedecendo à seguinte sequência: **Título Original, Título Traduzido, Autor(es), Filiação Institucional, Abstract (Keywords), Resumo (Palavras-chave), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinação destes três últimos), **Agradecimentos** (facultativo) e **Referências Bibliográficas**. As Notas de Pesquisa obedecem à sequência acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escritas em texto corrido. Para essa categoria, o artigo submetido deve possuir alto grau de ineditismo e originalidade, trazendo resultados novos de importância evidente.

Características dos elementos de um trabalho científico

Título Original

O título “cheio” e o subtítulo (se houver) não devem exceder 15 palavras. Não deverá aparecer nenhuma abreviatura, e os nomes de espécies ou palavras em latim deverão vir em itálico. Evitar (por exemplo) títulos que iniciem com: Estudos preliminares; Observações sobre. Não usar o nome do autor e data de citação em nomes científicos.

Autor(es)/Filiação

Na identificação, deve constar: nome completo e por extenso de todos os autores (sem abreviação). A Filiação Institucional deve informar os nomes próprios de todas as

instituições e não suas traduções: Laboratório, Departamento, Faculdade ou Escola, Instituto, Universidade, Cidade, Estado e País, exatamente nessa ordem. No rodapé, deve constar as informações do autor para correspondência: Endereço completo, telefone e e-mail atualizado, nessa ordem.

Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas só serão admitidas desde que sejam de fácil consulta aos leitores. Não serão aceitas referências de trabalhos publicados em anais de congressos e as teses devem estar disponíveis para consulta em sites oficiais, por exemplo, Banco de Teses da Capes: <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. Todas as citações no texto devem ser cuidadosamente checadas em relação aos nomes dos autores e datas, exatamente como aparecem nas referências.

“Abstract” e Resumo

Devem conter no máximo 200 palavras, em um só parágrafo sem deslocamento. Não devem conter citações bibliográficas. Siglas e abreviações de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso, por exemplo, Indirect Fluorescence Assay (IFA). Devem ser informativos, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. O abstract redigido em língua inglesa e o resumo em língua portuguesa, ambos seguidos por keywords e palavras-chave, respectivamente.

Keywords e Palavras-chave

As palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho. São limitadas em no máximo 6 (seis).

Introdução

Explicação clara e objetiva do estudo, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

Material e Métodos

Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Métodos estatísticos devem ser explicados ao final dessa seção.

Resultados

O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo: sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações auto explicativas.

Discussão

Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente aos resultados e conclusão. Enfatizar a importância de novos achados e novas hipóteses identificadas claramente com os resultados.

Tabelas

Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e no final; e devem ser enviadas em formato editável (desejável excel). A legenda (título) é precedida da palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário. Devem ser digitadas em espaço duplo em arquivos separados.

Figuras

As figuras, tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, fluxograma e esquema, devem ser enviadas em formato .tif, .gif ou .jpg, com no mínimo de 300 dpi de resolução e numeradas consecutivamente. As legendas devem ser precedidas da palavra

Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções, em folha separada em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário.

Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, como foram obtidas. Se a escala for dada às figuras, utilizar a escala BAR em todas as ilustrações ao invés de numérica, que pode ser alterada com a redução das figuras.

Conclusões

As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos autores. Nesse caso, esse item não será necessário.

Agradecimentos

Quando necessário, limitados ao indispensável.

Referências Bibliográficas

A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética e, posteriormente, ordenadas em ordem cronológica, se necessário. Mais de uma referência do(s) mesmo(s) autor(es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras “a”, “b”, “c”, etc, inseridas após o ano de publicação.

Títulos de periódicos devem ser abreviados conforme Index Medicus - <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>. *Livros* Levine JD. *Veterinary protozoology*. Ames: ISU Press; 1985.

Capítulo de livro

Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS, Threlfall WR. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 667-680.

Artigo de periódico

Paim F, Souza AP, Bellato V, Sartor AA. Selective control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in fipronil-treated cattle raised on natural pastures in Lages, State of Santa Catarina, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(1): 13-16.

Tese e Dissertação

Araujo MM. *Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de patos, Paraíba - Brasil* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

Documento eletrônico

Centers for Disease Control and Prevention. *Epi Info* [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>. **Obs.** Nas referências, apresentar os nomes dos seis primeiros autores; para referências com mais de seis autores, apresentar os seis primeiros nomes seguidos da expressão et al.

Citações

As citações devem seguir o sistema autor-data: **Um autor:** nome do autor e ano de publicação Levine (1985) ou (LEVINE, 1985) **Dois autores:** os nomes dos autores e ano da publicação Paim e Souza (2011) ou (PAIM; SOUZA, 2011)

Três ou mais autores: nome do primeiro autor seguido de “et al.” e o ano de publicação Araújo et al. (2002) ou (ARAÚJO et al., 2002)

Prova Gráfica

O trabalho diagramado em formato pdf., será enviado por e-mail ao autor correspondente. Alterações no artigo, quando aceitas para publicação, devem ser realizadas nesse estágio, com permissão do editor-chefe. Portanto, o trabalho deve ser cuidadosamente corrigido antes de responder ao editor, pois inclusões de correções subseqüentes (indicação de novo autor, mudança de parágrafos inteiros ou tabelas) não podem ser garantidas.

8.4 NORMAS DO CAPÍTULO III

NSTRUÇÕES AOS AUTORES ASV - 13d

CASE REPORT

Destinado para a descrição de quadros clínicos/cirúrgicos/ sintomatológicos/terapêuticos, etc. *de natureza ou evolução incomum*. **PRIMEIRAMENTE encaminhar os trabalhos para uma triagem inicial a ser feita pelo Conselho Editorial. NÃO SERÃO aceitos aqueles FORA dos padrões específicos da ASV. O ABSTRACT (OBRIGATÓRIO: total mínimo de 3400 caracteres com espaços e máximo de 3900 cce, SEM contar keywords e descritores). É composto de três partes: 1. *Background* (seção curta com no máximo de 700 cce) que sempre terminará com o objetivo do relato. 2. *Case*: descrição detalhada. 3. *Discussion*: com as conclusões e perspectivas do relato. IMPORTANTE: informar o endereço postal completo do *autor principal* para Correspondência. Sempre Informar a filiação (nome da Instituição com SIGLA e local) dos outros autores (nomes completos). Esta informação deve ser colocada abaixo da nominata dos autores. *Nunca como nota de rodapé*. Fornecer DOIS e-mails (autores diferentes) para contato durante *avaliação* do trabalho e agilização dos trâmites necessários.**

CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS

Autoria: *ASV se reserva o direito de LIMITAR a participação de no máximo OITO autores*. O reconhecimento da autoria deve estar baseado em contribuição substancial relacionada aos seguintes aspectos: 1) Efetiva e relevante participação no acompanhamento do caso; 2) Redação do artigo (análise e interpretação dos dados) e/ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual. Os auxiliares da equipe que não se encaixem nestes critérios prioritários podem figurar na seção de *Acknowledgements*. Os relatos serão publicados em *ordem de aprovação final de todos os requisitos* [conteúdo (texto e ilustrações) e correta formatação].

ATENÇÃO: *Com a recomendação dos relatores, o artigo passará por revisão do inglês (pago pelos autores), realizado por serviços especializados recomendados pela ASV.*

Resumo dos Requisitos Técnicos:

- Apresentar o texto em fonte Times, tamanho 12, espaço duplo e margem de 2,5cm. *NUNCA colocar nota de rodapé em nenhuma página.*
- Enumerar em ordem crescente, na margem esquerda, todas as linhas do trabalho.
- Imagens: As imagens devem ser digitalizadas em 300 dpi em CMYK (coloridas) e Gray Scale (tons de cinza), ao serem salvas **deve ser selecionada a extensão TIFF**. Podem ser **enviadas em ARQUIVOS SEPARADOS por e-mail**. Se necessário será solicitada a remessa das mesmas em

CD/DVD. Para a digitalização pode ser usado qualquer programa de imagem, **mas nunca enviar incorporado em documento Word.** As fotografias feitas através de microscópio devem conter indicadores internos de escala. Os símbolos, fl echas ou letras usados em fotomicrografi as **Acta Scientiae Veterinariae 2013** devem contrastar claramente com o fundo, com a escala (bar) inserida e a magnitude descrita na legenda. **Para as fotos em câmara digital,** a máquina deve ter **resolução superior a 5 Megapixels** (observar no momento de bater a foto se a câmara está confi gurada em resolução máxima). **Nunca enviar as imagens com extensão jpg ou gif.** • Unidades de Medidas: Medidas de comprimento, altura, peso e volume devem ser expressas em unidades métricas (metros, gramas ou litros, ou seus múltiplos decimais). As temperaturas devem ser dadas em graus Celsius. A pressão sanguínea em milímetros de mercúrio. Todos os valores hematológicos ou bioquímicos devem ser apresentados em unidades do sistema métrico decimal de acordo com o Sistema Internacional de Medidas (SI).

- Abreviações: devem ser evitadas e, se empregadas [só abreviatura padrão], defi nidas na primeira menção, salvo se forem unidades comuns de medida. Para nomes latinos binominais, abreviar o gênero após citação inicial, exceto quando iniciar frase.
- Incluir permissão para reproduzir material previamente publicado.
- Anexar também termo de cessão dos direitos autorais.

Enviar o material SOMENTE para e-mail da revista: E-mail: actascivet@ufrgs.br ou para o seguinte endereço: Conselho Editorial da Revista ASV - FaVet/UFRGS Caixa Postal 15017 91591-970 Porto Alegre, RS, Brasil Fone: + 55 (51) 3308-6964 / FAX : + 55 (51) 3308-7305

IMPORTANTE: A taxa de publicação [R\$ 300,00] somente deverá ser paga (apresentar comprovante) após a revisão e aprovação final do trabalho. Poderão incidir custos adicionais relativos à correção do abstract/texto em inglês e/ou **fotolitagem colorida [R\$ 100,00]**. Antes de qualquer pagamento, aguarde instruções via e-mail.

Lembrete: Com a aprovação dos relatores, o artigo passará por revisão do inglês (pago pelos autores), realizado por **serviços especializados recomendados pela ASV.**

ESTRUTURA BÁSICA DOS TRABALHOS

PÁGINA INICIAL

1. Título não deve exceder 60 palavras. **Title:** com letras capitalizadas.

Nomes completos de todos autores. Apresentar as filiações.

2. ABSTRACT: na forma direta e no passado. OBRIGATÓRIO: total mínimo de 3400 caracteres com espaços e máximo de 3900 cce, SEM contar keywords e descritores). **É composto de três partes:**

1. Background (seção curta com no máximo de 700 cce): destacando a importância do assunto e que sempre terminará com o objetivo do relato. **2. Case:** descrição detalhada. **3. Discussion:** com as conclusões e perspectivas do relato. **Abstract deve ser preparado por tradutor / serviço reconhecidamente qualificado (anexar o comprovante). ASV se reserva o direito de RECUSAR texto em inglês considerado tecnicamente inadequado.**

PÁGINAS SEGUINTE

3. INTRODUÇÃO: Deve ser **CURTA**, clara e objetiva, contendo informações que justifiquem a importância do relato (originalidade) e restringindo as citações ao assunto específico. Sempre finalizar com o (s) objetivo (s) do trabalho. **É obrigatório considerar o limite MÍNIMO** de 700 cce e o **MÁXIMO** de 1700 c.c.e. Obs.: Pode ser similar ao texto do “background” [primeira parte do Abstract e que não deve ultrapassar 700 c.c.e].

4. RELATO DO CASO: destinado para a descrição de quadros clínicos/cirúrgicos/sintomatológicos/terapêuticos, etc. de natureza ou evolução incomum. Recomenda-se até 6 p. (incluindo as ilustrações) e 20 referências. **É obrigatória a apresentação de no mínimo 2 figuras ilustrativas** de tamanho padrão (7,5cm de largura), **comparando várias situações** [antes x pós-tratamento ou cirurgia, lesão macroscópica x achado histopatológico; lesão x cultivo macroscópico x aspecto microscópico, etc.].

5. DISCUSSÃO: O conteúdo deve ser **interpretativo** e as hipóteses e especulações formuladas embasadas nos dados obtidos pelos aa. e, relacionadas ao conhecimento atual sobre o tema, fornecido por outros estudos. Nesta seção referenciar somente a literatura essencial. Concluir com as implicações dos achados e perspectivas.

Observação sobre as citações: Normalmente citadas no texto **por números entre colchetes**, correspondendo aos aa. ordenados e numerados por ordem alfabética. Exs.: [2], [7,9,16],[23-27,31,33,45-48]. **Só quando for essencial citar o nome dos aa. no texto.** Observe as sugestões: A primeira descrição coube a Autor & Autor [3]...; Autor & Autor [32] iniciaram...; Autor *et al.* [18] em 1958... Os dados não publicados ou comunicações pessoais só devem aparecer no texto assim: (A.A.autor, comunicação pessoal, ano) e (C.D.autor & E.F. autor, dados não publicados); nestes casos informar antes das Referências o endereço completo ou e-mail dos aa.

6. SOURCES AND MANUFACTURERS. usar para referenciar a origem dos produtos comerciais citando f rma, cidade e País.Devem ser numeradas (sobrescrito) consecutivamente e apresentadas antes das referências.

7. Acknowledgements. Se necessários, devem ser sucintos e dirigidos para signifi cativa assistência técnica, cooperação ou orientação recebida de colegas, etc. Quando se aplicar.

8. Declaration of interest. Quando se aplicar.

9. REFERENCES: Atenção para todos os detalhes. Os trabalhos não serão analisados enquanto as mesmas estiverem incompletas ou fora das normas. Relacionar somente em ordem alfabética e numerada, os trabalhos publicados e seguir as especificações da Revista conforme os vários exemplos abaixo. Sequencia:Número / Referenciar sobrenome (letra maiúscula só a inicial) sem vírgulas e iniciais de todos aa. seguidas de ponto e separados por vírgula entre cada autor (usar “&” para separar os últimos aa. / Ano da publicação. / Título do artigo. / Nome completo da revista em itálico (s/abreviação). / n. do volume (n. fascículo): pp-pp.

• **TRABALHOS**

→ COM DOIS AUTORES:

Spilki F.R. & Arns C.V. 2008. Vírus respiratório sincicial bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36(3): 197-214.

→ COM VÁRIOS AUTORES:

Pereira S.A., Schubach T.M.P., Gremião I.D.F., Silva D.T., Figueiredo F.B., Assis N.V. & Passos S.R.L. 2009. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(4): 311-321.

Obs.1: A numeração das referências segue a prioridade da **ordem alfabética dos sobrenomes dos diversos autores/ co-autores** e não do ano da publicação. Exemplos:

7 Berlinguer F., Leoni G., Bogliolo L., Pintus P.P., Rosati I., Ledda S. & Naitana S. 2004.

8 Bernardi M.L., Cotinot C., Payen E. & Delouis C. 1996.

9 Bernardi M.L. & Delouis C. 1995.

10 Bernardi M.L. & Delouis C. 1996.

11 Bernardi M.L., Fléchon J-E. & Delouis C. 1996.

26 Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A., Par-rilla J.L., Vazquez J.L. & Day B.N. 2002.

27 Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A. & Vazquez J.L. 2001.

28 Martini R. L. 1998.

29 Matthijsa A., Hakze R., Potsma A. & Woelders H. 2000.

30 Matthijsa A., Harkema W., Engel B. & Woelders H. 2000.

68 Tervit H.R., Whittingham D.G. & Rowson L.E.A. 1972.

69 Thompson J.G. 1997.

70 Thompson J.G., Gardner D.K., Pugh P.A., McMillan W.H. & Tervit H.R. 1995.

71 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A., Donnelly P.E. & Tervit H.R. 1990.

72 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A. & Tervit H.R. 1992.

73 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A., Wright R.W. & Tervit H.R. 1991.

Obs.2: Para referências com *idêntica ordenação dos aa.*, mesmo ano de publicação e em diferentes Revistas, dar prioridade de numeração para aquela que foi citada primeiro no trabalho. Se for na mesma Revista, priorizar a referência com numeração mais baixa.

→ EM VOLUME COM SUPLEMENTO:

Pier A.C., Cabañes F.J., Chermette R., Ferreiro L., Guillot J., Jensen H.E. & Santurio J.M. 2000. Prominent animal mycoses from various regions of the world. *Medical Mycology*. 38(Suppl 1): 47-58.

→ EM FASCÍCULO SEM VOLUME:

Turan L., Wredmark T. & Fellander-Tsai I. 1995. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clinical of Orthopedic*.(320): 110-114.

→ SEM VOLUME E SEM FASCÍCULO:

Schulman R.L. 2003. Insulin and other therapies for diabetes mellitus. *Veterinary Medicine*. Abril: 334-347.

→ EM FORMATO ELETRÔNICO:

Morse S.S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*. 1: 7-15. [Fonte: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>>].

→ IN PRESS/ Publicação ahead of print [mencionar as datas]:

Teifke J.P., Driemeier D. & Kaden V. 2002. Arrest of metaphyseal ossification with classical swine fever. *Veterinary Record*. [in press].

→ COMPLETO EM EVENTO:

[Sempre com o N.º do evento (Cidade e País)] **Bortolozzo F.P., Uemoto D.A., Wentz I. & Pozzobon M.C. 1999.** Reproductive performance of gilts submitted to artificial insemination in different intervals before ovulation. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Board Semen Preservation* (Beltsville, U.S.A.). pp.239-240.

→ EM COLEÇÃO OU SÉRIE:

Jellieff D.B. 1968. Evaluación del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. [Serie de Monografías, 53], 201p.

• **RESUMOS**

[Sempre com o N.º do evento (Cidade e País)]

→ PUBLICADO EM ANAIS:

Bisol J.F.W., Vieira M.J., Keller A., Mattos R.C. & Gregory R.M. 2000. Efeito da adição de antibióticos ao diluente de sêmen resfriado equino na fertilidade de éguas. In: *Resumos do XII Salão de Iniciação Científica da UFRGS* (Porto Alegre, Brasil). p.125.

→ PUBLICADO EM ANAIS COM VÁRIOS VOLS.:

Barcellos D.E.S.N., Razia L.E. & Borowski S.M. 2002. Microagglutination test detecting antibodies against *Brachyspira pilosicoli* [paper 537]. In: *Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society*. v.2. (Ames, U.S.A.). p.362.

→ PUBLICADO EM REVISTA:

Reischak D., Costa U.M., Moojen V. & Ravazzolo A.P. 1999. Ovine synovial membrane cell line permissive to *in vitro* caprine lentivirus replication [abstract A-097]. In: *Virologica 99* (Curitiba, Brazil). *Virus Reviews & Research*. 4(1): 81-82.

• **DISSERTAÇÕES / TESES**

Machado M.L.S. 2001. Dermatofitoses e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. 82f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

• **LIVROS**

[Sempre com nome da Cidade: nome da Editora] → CAPÍTULO EM LIVRO COM AUTORIA: **Rodrigues J.L. 1982.** Transferência Embrionária. In: Mies Filho A. (Ed). *Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial*. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, pp.710-720. [mencionar o Ed ou Eds]

→ CAPÍTULO EM LIVRO SEM AUTORIA:

Solomon S.E. & Nascimento V.P. 1994. Hen's eggshell structure and function. In: *The Microbiology of the Avian Egg*. London: Chapman & Hall, pp.1-24.

→ CITAÇÃO DE LIVRO:

Bladh W. H. 1971. *Nuclear Medicine*. 2nd edn. New York: Mac Graw-Hill, 858p.

EXEMPLOS - PADRÃO ASV

Exemplo 1

- 1 **Benitah N. 2006.** Canine nasal aspergillosis. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 21(2): 82-88.
- 2 **Cadwallader J.A., Goulden B.E., Baxter M., Wyburn R.S. & Alley M.R. 1973.** Rhinitis and sinusitis involving *Aspergillus fumigatus* in a dog. *New Zealand Veterinary Journal*. 21(11): 229-233.
- 3 **Davey T.N. 2003.** Aspergilose. In: Tilley L.P. & Smith Jr. F.W.K. (Eds). *Consulta veterinária em 5 minutos, espécies canina e felina*. 2.ed. São Paulo: Manole, pp.460-461.
- 4 **Day M.J. 2009.** Canine sino-nasal aspergillosis: parallels with human disease. *Medical Mycology*. 47(Suppl 1): s315-s323.
- 5 **De Lorenzi D., Bonfanti U., Masserdotti C., Caldin M. & Furlanello T. 2006.** Diagnosis of canine nasal aspergillosis by cytological examination: a comparison of four different collection techniques. *Journal of Small Animal Practice*. 47(6): 316-319.
- 6 **Harvey C.E. & O'Brien J.A. 1983.** Nasal aspergillosis and penicilliosis. In: Kirk R.W. (Ed). *Current Veterinary Therapy VIII*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., pp.236-240.
- 7 **Hawkins E.C. 2006.** Distúrbios da Cavidade Nasal. In: Nelson R.W. & Couto C.G. (Eds). *Medicina interna de pequenos animais*. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp.219-230.
- 8 **Johnson L.R., Drazenovich T.L., Herrera M.A. & Wisner E.R. 2006.** Results of rhinoscopy alone or in conjunction with sinuscopy in dogs with aspergillosis: 46 cases (2001-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 228(5): 738-742
- 9 **Kohn B., Kittner A., Werner H., Schmitz S., Rudolph R. & Brunnberg L. 2002.** Nasal aspergillosis in dogs - diagnosis and therapy. *Kleintierpraxis*. 47(7):415-426.
- 10 **Lane J.G., Clayton-Jones D.G., Thoday K.L. & Thomsett L.R. 1974.** The diagnosis and successful treatment of *Aspergillus fumigatus* infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. *Journal of Small Animal Practice*. 15(2): 79-87.
- 11 **Mathews K.G. 2004.** Fungal Rhinitis. In: King L.G. (Ed). *Textbook of respiratory disease in dogs and cats*. Missouri: Saunders, pp.284-293.
- 12 **Mathews K.G., Davidson A.P., Roplik P.D., Richardson E.F., Komtebedde J., Pappagianis D., Hector R.F. & Kass P.H. 1998.** Comparison of topical administration of clotrimazole through surgically versus nonsurgically placed catheters for treatment of nasal aspergillosis in dogs: 60 cases (1990-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 213(4): 501-506.

- 13 Menezes E.A., Trindade E.C.P., Costa M.M., Freire C.C.F., Cavalcante M.S. & Cunha F.A. 2004.** Airbone fungi isolated from Fortaleza city, State of Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 46(3): 133-137.
- 14 Mezzari A., Perin C., Santos Jr. S.S. & Bernd L.A.G. 2002.** Airbone fungi in the city of Porto Alegre, RioGrande do Sul, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 44(5): 269-272.
- 15 Mortellaro C.M., Della Franca P.D. & Caretta G.1989.** Aspergillus fumigatus, the causative agent of infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. *Mycoses*. 32(7): 327-335.
- 16 Peeters D. & Clercx C. 2007.** Update on Canine Sinonasal Aspergillosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 37(5): 901-916.
- 17 Pomrantz J.S., Johnson L.R., Nelson R.W. & Wisner E.R. 2007.** Comparison of serologic evaluation via agar gel immunodiffusion and fungal culture of tissue for diagnosis of nasal aspergillosis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 230(9): 319-323.
- 18 Saunders J.H. & Van Bree H. 2003.** Diagnosis of nasal aspergillosis in the dog. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 72: 399-408.
- 19 Sharp N.J.H. 1998.** Aspergillosis and Penicilliosis. In: Greene C.E. (Ed). *Infectious diseases of the dog and cat*. 2nd edn. Philadelphia: Saunders, pp.714-722.
- 20 Tasker S., Knottenbelt C.M., Munro E.A., Stonehewer J., Simpson J.W. & Mackin A.J. 1999.** Aetiology and diagnosis of persistent nasal disease in the dog: a retrospective study of 42 cases. *Journal of Small Animal Practice*. 40(10): 473-478.
- 21 Turek M.M. & Lana S.E. 2007.** Canine nasosinal tumors. In: Withrow S.J. & MacEwen E.G. (Eds). *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4th edn. Philadelphia: Saunders Company, pp.525-539.
- 22 von Biberstein S.E., Spiro J.D. & Coll W. 1999.** Acinic cell carcinoma of the nasal cavity. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 120(5): 759-762.
- 23 Wilson D.W. & Dungworth D.L. 2002.** Tumors of the respiratory tract. In: Meuten D.J. (Ed). *Tumors in Domestic Animals*. 4th edn. Iowa: Blackwell, pp.365-399.
- 24 Windsor R.C., Johnson L.R., Herrgesel E.J. & De Cock H.E. 2004.** Idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis in dogs: 37 cases (1997-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 224(12): 1952-1957.

25 Wolf A.M. 1992. Fungal diseases of the nasal cavity of the dog and cat. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 22(5): 1119-1132.

26 Wuiermattei D.L. & Flo G.L. 1999. *Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair*. 3rd edn. Philadelphia: W.B. Saunders, 743p.

27 Zchwarz P.D. 1993. Fracture biomechanics of the appendicular skeleton: causes and assessment. In: Bojrab M.J., Smeak D.D. & Bloomberg M.S. (Eds). *Disease mechanisms in small animal surgery*. Philadelphia: Lea & Febiger, pp.1009-1026.

Exemplo 2

1 Beltran M.P. & Vasconcelos J.L.M. 2008. Conception rate in Holstein cows treated with GnRH or hCG on the fifth day post artificial insemination during summer. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60(3): 580-586.

2 Bender R.W., Nascimento A.B., Souza A.H., Ayres H., Araújo R.R., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. 2011. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) on day 5 after timed artificial insemination (TAI) on fertility in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 94(E-Suppl.1): 62.

3 Bisinotto R.S., Chebel R.C. & Santos J.E.P. 2010. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93(8): 3578-3587.

4 Breuel K.F., Spitzer J.C. & Henricks D.M. 1989. Systemic progesterone concentration following human chorionic-gonadotropin administration at various times during the estrous-cycle in beef heifers. *Journal of Animal Science*. 67(6): 1564-1572.

5 Brusveen D.J., Cunha A.P., Silva C.D., Cunha P.M., Sterry R.A., Silva E.P., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. 2008. Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during Ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 91(3): 1044-1052.

6 Brusveen D.J., Souza A.H. & Wiltbank M.C. 2009. Effects of additional prostaglandin F-2 alpha and estradiol-17 beta during Ovsynch in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 92(4): 1412-1422.

7 Bulman D.C. & Lamming G.E. 1978. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 54(2): 447-458.

8 Carter F., Forde N., Duffy P., Wade M., Fair T., Crowe M.A., Evans A.C.O., Kenny D.A., Roche J.F. & Lonergan P. 2008. Effect of increasing progesterone

concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development*. 20(3): 368-375.

9 Carter F., Rings F., Mamo S., Holker M., Kuzmany A., Besenfelder U., Havlicek, V., Mehta J.P., Tesfaye D., Schellander K. & Lonergan P. 2010. Effect of elevated circulating progesterone concentration on bovine blastocyst development and global transcriptome following endoscopic transfer of in vitro produced embryos to the bovine oviduct. *Biology of Reproduction*. 83(5): 707-719.

10 Cerri R.L.A., Chebel R.C., Rivera F., Narciso C.D., Oliveira R.A., Amstalden M., Baez-Sandoval G.M., Oliveira L.J., Thatcher W.W. & Santos J.E.P. 2011.

Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *Journal of Dairy Science*. 94(7): 3352-3365

11 Cerri R.L.A., Chebel R.C., Rivera F., Narciso C.D., Oliveira R.A., Thatcher W.W. & Santos J.E.P. 2011. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. *Journal of Dairy Science*. 94(7): 3342-3351.

12 Chebel R.C., Al-Hassan M.J., Fricke P.M., Santos J.E.P., Lima J.R., Martel C.A., Stevenson J.S., Garcia R. & Ax R.L. 2010. Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93(3): 922-931.

13 Christenson R.K., Ford J.J. & Redmer DA. 1985. Metabolic-clearance and production-rates of estradiol and progesterone during pubertal and postpubertal development in gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 75(1): 247-253.

14 Clemente M., de la Fuente J., Fair T., Al Naib A., Gutierrez-Adan A., Roche J.F., Rizos D. & Lonergan P. 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction* 138(3): 507-517.

15 Cunha A.P., Guenther J.N., Maroney M.J., Giordano J.O., Nascimento A.B., Bas S., Ayres H. & Wiltbank M.C. 2008. Effects of high vs. low progesterone concentrations during Ovsynch on double ovulation rate and pregnancies per AI in high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 91(Suppl 1): 246.
16 Dawson F.L.M. 1954. Progesterone in functional infertility of cattle. *Veterinary Records*. 66: 324-326.

17 Denicol A.C., Lopes Jr. G., Mendonça L.G.D., Rivera F.A, Guagnini F., Perez R.V., Lima J.R., Bruno R.G.S., Santos J.E.P. & Chebel R.C. 2012. Low progesterone

concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*. 95(4): 1794-1806.

18 De Silva A.W.M.V., Anderson G.W., Gwazdauskas F.C., McGilliard M.L. & Lineweaver J.A. 1981. Interrelationships with estrous behavior and conception in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 64(12): 2409-2418.

19 Diaz F.J., Anderson L.E., Wu Y.L., Rabot A., Tsai S.J. & Wiltbank M.C. 2002. Regulation of progesterone and prostaglandin F₂alpha production in the CL. *Molecular Cellular Endocrinology*. 191(1): 65-80.

20 Fischer-Tenhagen C., Thiele G., Heuwieser W. &Tenhagen B.A. 2010. Efficiency of a Treatment with Hcg 4 days After AI to Reduce Pregnancy Losses in Lactating Dairy Cows After Synchronized Ovulation. *Reproduction in Domestic Animals*. 45(3): 468-472.

21 Forde N., Beltman M.E., Duffy G.B., Duffy P., Mehta J.P., O'Gaora P., Roche J.F., Lonergan P. & Crowe M.A. 2011. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biology of Reproduction*. 84(2): 266-278.

22 Funston R.N., Lipsey R.J., Geary T.W. & Roberts A.J. 2005. Effect of administration of human chorionic gonadotropin after artificial insemination on concentrations of progesterone and conception rates in beef heifers. *Journal of Animal Science*. 83(6): 1403-1405.

23 Ghanem M.E., Nakao T., Nakatani K., Akita M. & Suzuki T. 2006. Milk progesterone profile at and after artificial insemination in repeatbreeding cows: effects on conception rate and embryonic death. *Reproduction in Domestic Animals*. 41(2): 180-183.

24 Gumen A., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. 2003. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 86(10): 3184-3194.

25 Hanlon D.W., Davidson P.J., Hittmann A.R. & Joe AK. 2005. Supplementing previously treated anestrous dairy cows with progesterone does not increase firstservice conception rate. *Theriogenology*. 63(1): 239-245.

26 Hanlon D.W., Jarratt G.M., Davidson J.P.J., Millar A.J. & Douglas V.L. 2005. The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology*. 63(7): 1938-1945.

27 Herlihy M.M., Giordano J.O., Souza A.H., Ayres H., Ferreira R.M., Keskin A., Nascimento A.B., Guenther J.N., Gaska J.M., Kacuba S.J., Crowe M.A., Butler S.T.

& Wiltbank M.C. 2012. Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 95(12): 7003-7014.

28 Herrick J.B. 1953. Clinical observation of progesterone therapy in repeat breeding heifers. *Veterinary Medicine*. 48: 489-490.

29 Howard J.M., Manzo R., Dalton J.C., Frago F. & Ahmadzadeh A. 2006. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 95(3-4): 224-233.

30 Hunter R.H.F. 2005. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reproduction, Nutrition and Development*. 45(3): 281-290.

31 Inskip E.K. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science*. 82(E-Suppl): E24-39.

32 Janson P.O., Damber J.E. & Axen C. 1981. Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*. 63(2): 491-497.

32 Kendall N.R., Flint A.P.F. & Mann G.E. 2009. Incidence and treatment of inadequate postovulatory progesterone concentrations in repeat breeder cows. *Veterinary Journal*. 181(2): 158-162.

34 Larson S.F., Butler W.R. & Currie W.B. 1997. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 80(7): 1288-1295.

35 Larson S.F., Butler W.R. & Currie W.B. 2007. Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 102(1-2): 172-179.

36 Larson J.E., Krisher R.L. & Lamb G.C. 2011. Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*. 23(2): 311-318.

37 Lemley C.O., Wilmoth T.A., Tager L.R., Krause K.M. & Wilson M.E. 2010. Effect of a high cornstarch diet on hepatic cytochrome P450 2C and 3A activity and progesterone half-life in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93(3): 1012-1021.

- 38 Lonergan P., Woods A., Fair T., Carter F., Rizos D., Ward F., Quinn K. & Evans A. 2007.** Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 19(7): 861-868.
- 39 Mann G.E. & Lamming G.E. 1999.** The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 34(3-4): 269-274.
- 40 Martins J.P.N., Policelli R.K., Neuder L.M., Raphael W. & Pursley J.R. 2011.** Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F-2 alpha of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 94(6): 2815-2824.
- 41 McNeill R.E., Sreenan J.M., Diskin M.G., Cairns M.T., Fitzpatrick R., Smith T.J. & Morris D.G. 2006.** Effect of systemic progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. *Reproduction Fertility and Development*. 18(5): 573-583.
- 42 Moreira F., de la Sota R.L., Diaz T. & Thatcher W.W. 2000.** Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 78(6): 1568-1576.
- 43 Moreira F., Orlandi C., Risco C.A., Mattos R., Lopes F. & Thatcher W.W. 2001.** Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 84(7): 1646-1659.
- 44 Morris D. & Diskin M. 2008.** Effect of progesterone on embryo survival. *Animal*. 2(8): 1112-1119.
- 45 Murray M. 1991.** Microsomal cytochrome-P450-dependent steroid metabolism in male sheep liver – Quantitative importance of 6-beta-hydroxylation and evidence for the involvement of a P450 from the IIA subfamily in the pathway. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*. 38(5): 611-619.
- 46 Murray M. 1992.** Participation of the α cytochrome P450 enzyme from the 2C subfamily in progesterone 21-hydroxylation in sheep liver. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*. 43(6): 591-593.
- 47 Nascimento A.B., Souza A.H., Guenther J.N., Dalla Costa F.P., Sartori R. & Wiltbank M.C. 2012.** Effects of treatment with human chorionic gonadotrophin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development*. [in press].

- 48 Nasser L.F., Sá Filho M.F., Reis E.L., Rezende C.R., Mapletoft R.J., Bo G.A. & Baruselli P.S. 2011.** Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 76(2): 320-327.
- 49 Niswender G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson M.K. & McIntush E.W. 2000.** Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiology Review*. 80(1): 1-29.
- 50 O'Shea J.D., Rodgers R.J. & D'Occhio M.J. 1989.** Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*. 85(2): 483-487.
- 51 Parr R.A., Davis I.F., Miles M.A. & Squires T.J. 1993.** Liver blood-flow and metabolic-clearance rate of progesterone in sheep. *Research Veterinary Science*. 55(3): 311-316.
- 52 Ribeiro E.S., Bisinotto R.S., Favoreto M.G., Martins L.T., Cerri R.L., Silvestre F.T., Greco, L.F., Thatcher W.W. & Santos J.E. 2012.** Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F2 α as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*. 78(2): 273-284.
- 53 Rivera F.A., Mendonça L.G.D., Lopes G., Santos J.E.P., Perez R.V., Amstalden M., Correa-Calderon A. & Chebel R.C. 2011.** Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction*. 141(3): 333-342.
- 54 Robinson N.A., Leslie K.E. & Walton J.S. 1989.** Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 72(1): 202-207.
- 55 Sangsritavong S. 2002.** Studies of steroid metabolism in dairy cattle. 90f. Madison, WI. (PhD Dissertation – Dairy Science) - University of Wisconsin, USA.
- 56 Sangsritavong S., Combs D.K., Sartori R.F., Armentano L.E. & Wiltbank M.C. 2002.** High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol 17 β in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 85(11): 2831-2842.
- 57 Santos J.E.P., Thatcher W.W., Pool L. & Overton M.W. 2001.** Effect of human chorionic gonadotropin, on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 79(11): 2881-2894.

- 58 Schmitt E.J.P., Diaz T., Barros C.M., delaSota R.L., Drost M., Fredriksson E.W., Staples C.R., Thorner R. & Thatcher W.W. 1996.** Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Animal Science*. 74(8): 1074-1083.
- 59 Shams-Esfandabadi N., Shirazi A., Mirshokrai P. & Bonyadian M. 2007.** Influence of hCG administration after AI on conception rates and serum progesterone concentration in cattle. *Pakistan Journal of Biology Science*. 10(16): 2709-2713.
- 60 Silva C.C., Groome N.P. & Knight P.G. 1999.** Demonstration of a suppressive effect of inhibin alpha-subunit on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 115(2): 381-388.
- 61 Silva C.C. & Knight P.G. 2000.** Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of *in vitro* matured oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 115(2): 381-388.
- 62 Smith D.L., Stinefelt B.M., Blemings K.P. & Wilson M.E. 2006.** Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes. *Journal of Animal Science*. 84(5): 1102-1109.
- 63 Souza A.H., Ayres H., Ferreira R.M., Wiltbank M.C. 2008.** A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 70(2): 208-215.
- 64 Souza A.H., Gumen A., Silva E.P.B., Cunha A.P., Guenther J.N., Peto C.M., Caraviello D.Z. & Wiltbank M.C. 2007.** Supplementation with estradiol-17 beta before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90(10): 4623-4634.
- 65 Souza A.H., Silva E.P.B., Cunha A.P., Gumen A., Ayres H., Brusveen D.J., Guenther J. N. & Wiltbank M.C. 2011.** Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology*. 75(4): 722-733.
- 66 Sreenan J.M. & Diskin M.G. 1983.** Early embryonic mortality in the cow - its relationship with progesterone concentration. *Veterinary Records*. 112(22): 517-521.
- 67 Sterry R.A., Welle M.L. & Fricke P.M. 2006.** Treatment with gonadotropin-releasing hormone after first timed artificial insemination improves fertility in noncycling lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 89(11): 4237-4245.

- 68 Stevenson J.S., Portaluppi M.A., Tenhouse D.E., Lloyd A., Eborn D.R., Kacuba S. & DeJarnette J.M. 2007.** Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *Journal of Dairy Science*. 90(1): 331-340.
- 69 Stevenson J.S. & Pulley S.L. 2012.** Pregnancy per artificial insemination after presynchronizing estrous cycles with the Presynch-10 protocol or prostaglandin F(2 α) injection followed by gonadotropin-releasing hormone before Ovsynch-56 in 4 dairy herds of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 95(11): 6513-6522.
- 70 Stevenson J.S., Pursley J.R., Garverick H.A., Fricke P.M., Kesler D.J., Ottobre J.S. & Wiltbank M.C. 2006.** Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *Journal of Dairy Science*. 89(7): 2567-2578.
- 71 Stevenson J.S., Tenhouse D.E., Krisher R.L., Lamb G.C., Larson J.E., Dahlen C.R., Pursley J.R., Bello N.M., Fricke P.M., Wiltbank M.C., Brusveen D.J., Burkhart M., Youngquist R.S. & Garverick H.A. 2008.** Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. *Journal of Dairy Science*. 91(7): 2901-2915.
- 72 Stormshak F., Inskeep E.K., Lynn J.E., Pope A.L. & Casida L.E. 1963.** Progesterone levels in corpora lutea and ovarian effluent blood of the ewe. *Journal of Animal Science*. 22(4): 1021-1026.
- 73 Stronge A.J. H., Sreenan J.M., Diskin M.G., Mee J.F., Kenny D.A. & Morris D.G. 2005.** Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*. 64(5): 1212-1224.
- 74 Villarroel A., Martino A., BonDurant R.H., Deletang F. & Sischo W.M. 2004.** Effect of post-insemination supplementation with PRID on pregnancy in repeat-breeder Holstein cows. *Theriogenology*. 61(7-8): 1513-1520.
- 75 Waldmann A., Reksen O., Landsverk K., Kommisrud E., Dahl E., Refsdal A. & Ropstad E. 2001.** Progesterone concentrations in milk fat at first insemination - effects on non-return and repeat-breeding. *Animal Reproduction Science*. 65(1-2): 33-41.
- 76 Walton J.S., Halbert G.W., Robinson N.A. & Leslie K.E. 1990.** Effects of progesterone and human chorionic-gonadotropin administration 5 days postinsemination on plasma and milk concentrations of progesterone and pregnancy rates of normal and repeat breeder dairy cows. *Canadian Journal of Veterinary Research- Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. 54(3): 305-308.

77 Willard S., Gandy S., Bowers S., Graves K., Elias A. & Whisnant C. 2003. The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology*. 59(8): 1799-1810.

78 Wiltbank M.C., Carvalho P.D., Keskin A., Hackbart K.S., Meschiatti M.A., Bastos M.R., Guenther J.N., Nascimento A.B., Herlihy M.M., Amundson M.C. & Souza A.H. 2011. Effect of progesterone concentration during follicle development on subsequent ovulation, fertilization, and early embryo development in lactating dairy cows. *Biology of Reproduction*. **85:685**.

79 Wiltbank J.N., Hawk H.W., Kidder H.E., Black W.G., Ulberg L.C. & Casida L.E. 1956. Effect of progesterone therapy on embryos survival in cows of lowered fertility. *Journal of Dairy Science*. 39(4): 456-461.

80 Wiltbank M., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S. & Gumen A. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*. 65(1): 17-29.