

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Estudo antigênico de amostras do vírus da raiva isoladas no Rio Grande do Sul

Aluna: Thais Fumaco Teixeira

Orientador: Prof<sup>o</sup> Paulo Michel Roehle

Trabalho apresentado como um dos requisitos para obtenção do grau em Bacharel no Curso de Ciências Biológicas Ênfase Molecular, Celular e Funcional.

BIO  
BIO  
291

Porto Alegre, Dezembro de 2004

**ESTUDO ANTIGÊNICO DE AMOSTRAS DO VÍRUS DA RAIVA ISOLADAS  
NO RIO GRANDE DO SUL**

Autores:

**Thais F. Teixeira<sup>1</sup>, Helena B. C. Ruthner Batista<sup>1</sup>, Eduardo Schmidt<sup>2</sup>, Paulo M. Roehc<sup>1,2\*</sup>**

1. Laboratório de Virologia, DM-ICBS/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

2. Equipe de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS.

\*Endereço Postal: Caixa Postal 2076, Porto Alegre RS Brasil CEP 90 001 970. Tel.: 51. 481 37 11; Fax: 51. 481 33 37

\*Email: proehc@ufrgs.br

**ABSTRACT.**-Teixeira T.F., Batista H.B.C.R., Schmidt E., Roehle P.M. 2004.[**Antigenic studies of rabies virus isolate in the state of Rio Grande do Sul**]. Estudo antigênico de amostras do vírus da raiva isoladas no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* Vol(x):pag-pag. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, FEPAGRO-Saúde Animal, Cx. Postal 2076, Porto Alegre, RS 90001-970, Brasil. E-mail: thaisny@bol.com.br

Rabies virus (RV) is regarded as an antigenically stable agent. Despite that, differences have been found among isolates from distinct species. In attempting to examine the occurrence of RV antigenic variants, a study was conducted on RV samples isolated at the rabies diagnosis laboratory of the Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, from January to October 2004. Thirty-three isolates from different species of origin were submitted to antigenic characterization with a panel of 12 monoclonal antibodies to *Lyssavirus* antigens. Such analyses allowed to distinguish two antigenic groups of variants; one major group (n=30) was formed by 29 bovine isolates and one equine isolate; another group was formed by three isolates, one from cattle and two from non haematophagous bats. Such antigenic differences, once confirmed by further studies, may also be useful as epidemiological markers to determine the host species of origin of the isolates.

INDEX TERMS: Rabies, monoclonal antibodies.

**RESUMO.**-O vírus da raiva é considerado muito estável antígenicamente, apesar disto diferenças têm sido encontradas entre amostras de vírus isoladas de diferentes espécies. Com a finalidade de identificar estas variantes do vírus da raiva, foi realizado um estudo antigênico de amostras do vírus da raiva isoladas no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, no período de janeiro a outubro de 2004. Trinta e três amostras de vírus isoladas de diferentes espécies animais foram submetidas à caracterização antigênica com um painel constituído por 12 anticorpos monoclonais (AcMs) dirigidos contra antígenos de *Lyssavirus*. Através dessa análise foi possível identificar dois grupos antígenicamente distintos, um deles formado pela maioria dos isolados de origem de bovinos (29 de bovinos e uma de eqüino) e outro grupo formado por duas amostras isoladas de morcegos não hematófagos e uma de origem bovina. As diferenças antigênicas aqui detectadas, se confirmadas por estudos subseqüentes, poderão vir a ser úteis inclusive como marcadores epidemiológicos para a determinação da origem dos isolados.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Raiva, anticorpos monoclonais.

## INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença aguda, quase que invariavelmente fatal, causada por um vírus neurotrópico e caracterizada principalmente por sinais de comprometimento nervoso. O vírus da raiva pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (Tordo 1996) e, como tal, possui um genoma de RNA de fita simples não segmentado, de polaridade negativa (Koprowski 1996). O gênero *Lyssavirus* está atualmente dividido em sete genótipos (Bourhy et al. 1993, Amengual et al. 1997, Gold et al. 1998). O principal genótipo do gênero é o vírus da raiva clássica (genótipo 1) que apresenta distribuição mundial (Smith et al. 1995) sendo o único genótipo, até o momento, isolado nas Américas. Os demais genótipos, Lagos bat (genótipo 2), Mokola (genótipo 3), Duvenhage (genótipo 4), EBL1 (genótipo 5), EBL2 (genótipo 6) e ABL (genótipo 7) formam o grupo denominado “vírus relacionados com a raiva”, os quais apresentam uma distribuição geográfica mais restrita.

O vírus rábico é mantido na natureza por dois ciclos ocasionalmente inter-relacionados: o ciclo urbano e o ciclo silvestre. No Brasil, o ciclo urbano da raiva é mantido principalmente por cães (Germano et al. 1990). A disseminação da raiva urbana ocorre através de agressões de animais infectados com o vírus rábico. Já no ciclo silvestre o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) é o principal reservatório do vírus, transmitindo a doença aos bovinos e ocasionalmente ao homem. Entretanto, outras espécies são eventualmente envolvidas, como é o caso dos morcegos não-hematófagos, os quais também podem transmitir o agente (Germano 1994).

Apesar do vírus da raiva ser considerado um vírus antigenicamente estável, diversos estudos têm evidenciado diferenças importantes entre as amostras as quais são denominadas “variantes” do vírus rábico (Loza-Rubio et al. 1999, Ito et al. 2001, Paez et al. 2003). Estas diferenças têm sido identificadas tanto na constituição antigênica das amostras, como na composição genômica das mesmas (Schaefer et al. 2004). Na caracterização antigênica de

variantes, anticorpos monoclonais (AcMs) específicos tem sido de extrema valia na identificação de variantes, o que não era possível com soros policlonais (King 1991, Losa-Rubio et al. 1996, Delpietro et al. 1997). Na maioria dos estudos envolvendo tais análises, os isolados são testados frente a painéis de distintos AcMs, o que é geralmente identificado por imunofluorescência indireta (King 1991, Schaefer 1999). O perfil de reatividade obtido permite a comparação entre as amostras e sua categorização de acordo com padrões de reação. Além da diferenciação entre variantes do vírus, esse tipo de análise permite ocasionalmente determinar a fonte de infecção, funcionando como uma importante ferramenta epidemiológica (Schaefer 2004). Em nosso laboratório tem sido utilizado um painel preparado contra antígenos de diferentes Lyssavirus. O mesmo tem demonstrado ser altamente eficaz na identificação de variantes.

O Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor é o centro de referência para diagnóstico de raiva no Rio Grande do Sul (RS). Anualmente, mais de 2500 amostras de animais suspeitos provenientes de todo o Estado são submetidas a diagnóstico na instituição. O presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização antigênica de amostras do vírus da raiva isoladas no período de janeiro a outubro de 2004.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Diagnóstico de raiva**

O diagnóstico de raiva foi realizado com base em metodologias padronizadas (Meslin et al. 1996). Essencialmente, o diagnóstico é realizado através do exame de impressões de tecido nervoso por imunofluorescência direta, sendo o resultado posteriormente confirmado através da inoculação em camundongos lactentes (Dean et al. 1996).

## Imunofluorescência direta

Impressões de tecido nervoso sob teste foram feitas em lâminas de microscopia e fixadas em acetona fria por 30 min. Após a fixação, as lâminas foram lavadas brevemente em PBS (NaCl 0,15 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,07 M, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 8 mM, H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 L, pH 7,2) e sobre as mesmas foi adicionado um conjugado fluoresceína/soro policlonal anti-nucleocapsídeo do vírus rábico (FIOCRUZ). As lâminas cobertas com conjugado foram então incubadas durante 30 minutos a 37 °C em câmara úmida. Após a incubação, estas foram lavadas em PBS, secas à temperatura ambiente e cobertas com uma lamínula montadas em glicerol a 50 % em PBS. Para a leitura das lâminas utilizou-se um microscópio de fluorescência (Zeiss Axiolab), com objetiva seca de 40 X e oculares de 10 X.

## Isolamento do vírus em camundongos

Camundongos lactentes ou de 3 a 4 semanas foram infectados por inoculação intracerebral com suspensões de tecido nervoso dos animais infectados, preparadas a 10% em PBS, pH 7,4 como descrito por Koprowski (1996).

## Amostras de vírus e caracterização antigênica

Trinta e três amostras de vírus rábico, sendo 30 de origem bovina, 2 de origem de morcegos não hematófagos e uma de um equino, foram isoladas no período sob estudo e submetidas à caracterização antigênica. As análises dos perfis de reatividade foram efetuadas com um painel de 12 AcMs dirigidos contra antígenos do nucleocapsídeo viral (Schaefer, 1999). Os AcMs 5A3, 5G2 e 7C1 foram preparados por Schaefer R. (1999); os AcMs L3, L18, DB1, DB3, DB4, D3, DB9 e M11 foram preparados por King A.(1991) e o AcM E5A7 foi preparado por Pantoja (1993). O padrão de reatividade foi avaliado através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI), como descrito previamente (King 1991,

Schaefer 1999). As amostras foram classificadas como positivas (reação evidenciada por IFI) ou negativas (reação não evidenciada).

## **RESULTADOS**

A figura 1 apresenta o número total de animais recebidos para diagnóstico de raiva e o total de amostras positivas. Entre janeiro e outubro de 2004 foram examinadas 2261 amostras. Desse total, 33 (1,45%), sendo 30 de bovinos (90,9%), 2 de morcegos não hematófagos (6,1%) e uma de eqüino (3,0%), tiveram diagnóstico positivo, correspondendo às amostras aqui caracterizadas. Todas as amostras de caninos (1888) foram negativas ao diagnóstico de raiva.

Quanto à análise antigênica, o perfil de reatividade dos isolados frente aos anticorpos monoclonais é mostrado na tabela 1. Oito dos doze AcMs (5A3, 5G2, 7C1, E5A7, L3, DB1, DB3 e DB4) reconheceram epitopos em todos os vírus isolados. Três dos doze AcMs (D3, DB9 e M11) não reagiram com nenhum dos isolados examinados. O AcM L18 não reagiu com epitopos de nenhum isolado exceto dois isolados de morcegos não-hematófagos e um isolado de bovino. Com base nesse perfil de reatividade, os isolados puderam ser divididos em dois grupos (tabela 1). O primeiro grupo consiste em isolados de vinte e nove bovinos e um eqüino e o segundo contem isolados de dois morcegos e um bovino com perfis de morcegos não-hematófagos.

## **DISCUSSÃO**

As amostras de caninos (1888 amostras – 83% do total), analisadas durante o período do trabalho foram negativas ao diagnóstico de raiva, isto demonstra que o ciclo urbano da raiva se mantém controlado no estado, já que não existem mais casos de raiva em caninos desde 1988.

Apesar da raiva urbana estar controlada no Rio Grande do Sul, a raiva em bovinos, transmitida essencialmente por morcegos hematófagos, continua endêmica. No presente estudo, trinta e três amostras do vírus da raiva foram submetidas à análise antigênica, sendo identificadas duas possíveis variantes do vírus. O grupo constituído pela variante mais frequentemente identificada foi constituído por 29 amostras de bovinos e 1 amostra de equino, as quais apresentaram o mesmo perfil identificado em amostras de morcegos hematófagos em estudos prévios (Schaefer et al. 2004). Estes dados são coerentes, uma vez que o morcego hematófago *Desmodus rotundus* é a principal fonte de infecção para herbívoros. A reação positiva frente ao AcM L18 permitiu identificar diferenças antigênicas em três amostras isoladas, sendo uma de origem bovina e duas de origem de morcegos não hematófagos, das espécies *Tadarida brasiliensis* e *Myotis nigricans*. Embora a única diferença antigênica detectável tenha sido a reatividade frente a um dos AcMs utilizados, tal achado pode ser significativo se futuramente apoiado por análises adicionais, tais como RT/PCR de segmentos genômicos ou sequenciamento. Estudos nesse sentido estão presentemente em andamento no laboratório.

É importante salientar que os perfis antigênicos detectados são bastante estáveis, pois mesmo após uma passagem do vírus no hospedeiro acidental (tal como é o caso em bovinos) ou inoculação experimental em camundongos, os resultados dos testes se mantêm inalterados. Portanto, tais variações parecem importantes, podendo ser indicativas de uma busca de adaptação do vírus à espécie hospedeira. Como exemplo, evidências recentes têm sugerido que o ciclo biológico da raiva em morcegos não hematófagos é distinto daquele em morcegos hematófagos, apesar de ocasionalmente essas espécies ocuparem o mesmo abrigo, embora em locais separados e independentes. As diferenças antigênicas aqui observadas podem, portanto, representar um aspecto desse esforço adaptativo.

A constatação da presença do vírus em morcegos não hematófagos e da possibilidade de que os mesmos estejam endemicamente infectados com o vírus da raiva introduz uma preocupação especial, em vista da possibilidade do contato humano com os mesmos. Por exemplo, o morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis* é bastante comum no meio urbano no Brasil e tem sido encontrado ocasionalmente contaminado com raiva, mesmo em grandes cidades onde não são encontrados morcegos hematófagos e onde a raiva canina é inexistente. Tal como as amostras de morcegos não hematófagos examinadas no presente trabalho isoladas no IPVDF e no município Marques de Sousa (PG 1844/04 e 2077/04 respectivamente). Dessa forma, os cuidados a serem tomados para evitar a contaminação de humanos devem ser revistos, buscando incluir uma maior conscientização sobre o potencial papel de morcegos não hematófagos na transmissão da doença.

Em conclusão, a caracterização antigênica com os AcMs aqui empregados pode ser importante na identificação de variantes antigênicas, as quais podem ter valor inclusive como marcadores epidemiológicos. Estudos futuros, com um maior número de isolados de diferentes espécies, deverão permitir uma avaliação mais aprofundada da eficácia dos AcMs na identificação dessas variantes em nosso meio.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecimentos à H.B.C.R.Batista e a E.Schmidt pela sua inestimável cooperação. Ao Prof<sup>o</sup> Paulo Michel Roehe pela orientação ao longo deste trabalho. TFT, HBCRB e PMR são bolsistas do CNPq. Apoio financeiro CNPq, FEPAGRO; FAPERGS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amengual B., Whitby J.E., King A., Cobo J.S., Bourhy H. 1997. Evolution of european bat lyssavirus. *J. Gen. Virol.* 78:2319-2328.

Bourhy H., Kissi B., Tordo N. 1993b. Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology.* 194:70-81.

Delpietro H.A., Hurí-Dhomen F., Larghi O.P., Mena-Segura C., Abramo L. 1997. Monoclonal antibody characterization of rabies virus strains isolated in the River Plate Basin. *J. Vet. Med.* B44:477-483.

Dean D.J., Abelseth M.K., Atanasiu P. 1996. The fluorescent antibody test In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (eds.). *Laboratory techniques in rabies.* 4.ed. World Health Organization, Geneva: 88-95.

Germano P.M.L., Silvia E.V., Miguel O., Sureau P. 1990. Variantes antigênicas Del vírus de la rabia aisladas en el Nordeste y Sudeste Del Brasil. Estudio Preliminar. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.* 108:39-45.

Germano P.M.L. 1994. Avanços na pesquisa da raiva. *Rev. Saúde Públ.* 28:86-91.

Gold A.R., Hyatt A.D., Lunt R., Kattenbelt J.A., Hengstberger S., Blacksell S.D. 1998. Characterization of a novel lyssavirus isolated from pteropid bats in Australia. *Virus Res.* 54:165-187.

Ito M., Arai Y.T., Itou T., Sakai T., Ito F.H., Takasaki T., Kurane I. 2001. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: Identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology.* 284:214-222.

King A.A. 1991. Studies of the antigenic relationships of rabies and rabies-related viruses using anti-nucleoprotein monoclonal antibodies. Thesis. Guilford, U.K., University of Surrey.

Koprowski H. 1996. The mouse inoculation test. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. (eds.). *Laboratory techniques in rabies*. 4.ed. World Health Organization, Geneva: 80-86.

Loza-Rubio E., Aguilar-Setién A., Bahloul C., Brochier B., Pastoret P.P., Tordo N. 1999. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in México. *Arch. Med. Res.* 30:144-149.

Loza-Rubio E., Vargas R., Hernandez E., Batalla D., Aguillar A. 1996. Investigation of virus rabies strains in México with a panel of monoclonal antibodies used to classify lyssavirus. *Bull. Pan Am. Hlth. Org.* 30:31-35.

Meslin F.-X., Kaplan M.M. 1996. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (eds.). *Laboratory Techniques in Rabies*. 4.ed. World Health Organization, Geneva: 9-27.

Páez A., Nuñez C., García C., Bóshell J. 2003. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: evidence for human and dog rabies associated with bats. *J. Gen. Virol.* 84:795-802.

Schaefer R. 1999. Produção de anticorpos monoclonais contra vírus rábico de origem bovina e caracterização de amostras. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Schaefer R. 2004. Estudos antigênicos e moleculares de amostras brasileiras do vírus da raiva e construção de um herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1) contendo a glicoproteína do vírus da raiva. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Smith J.S., Orciari L.A., Yager P.A. 1995. Molecular epidemiology of rabies in the United States. *Seminars in Virology.* 6:387-400.

Tordo N. 1996. Characteristics and molecular biology of rabies virus. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (eds.). Laboratory Techniques in Rabies. 4.ed. World Health Organization, Geneva: 28-51.

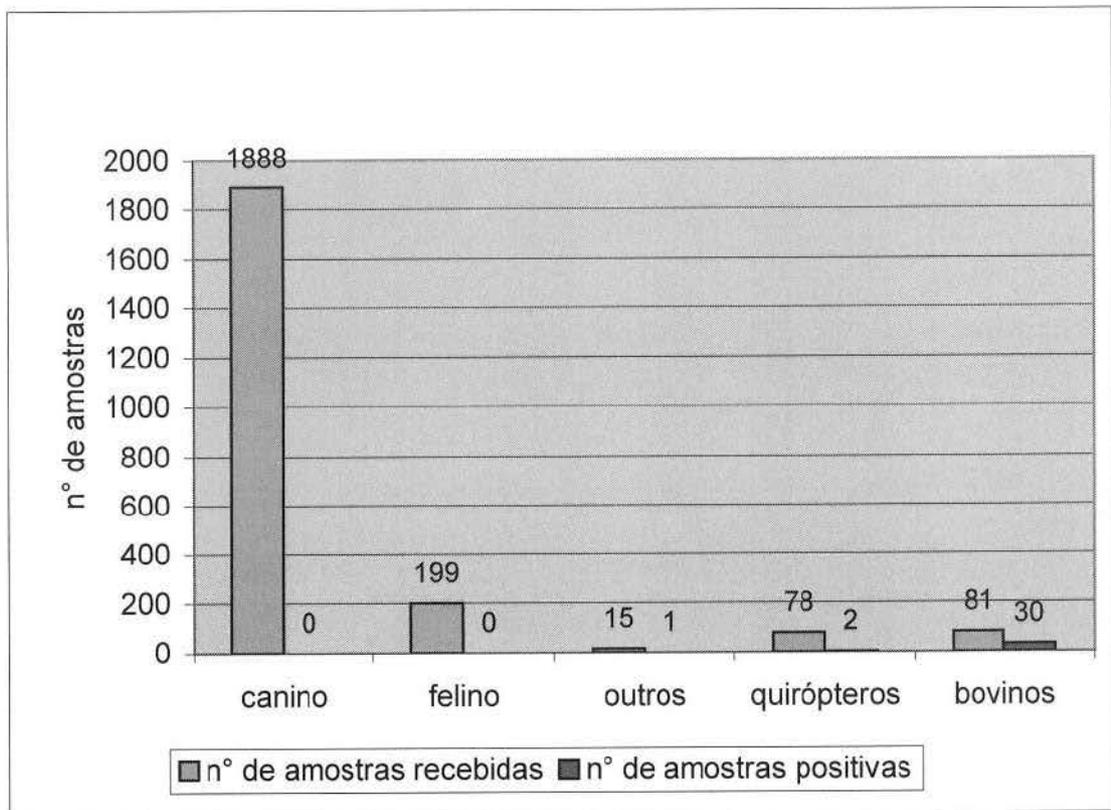
## ANEXO

### Legenda das figuras

**Figura 1.** Número de amostras recebidas por espécie e número de diagnósticos positivos para raiva no período de janeiro a outubro de 2004.

**Quadro 1.** Reatividade das amostras de vírus da raiva frente a um painel de anticorpos monoclonais.

Figura 1.



**Tabela 1.**

Isolados	Anticorpos Monoclonais											
	5A3	5G2	7C1	E5A7	L3	DB1	DB3	DB4	L18	D3	DB9	M11
PG 1844/04	+ <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	- <sup>b</sup>	-	-
PG 2077/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
PG 1097/04 AP 847	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
PG 035/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 81/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 90/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 509/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 978/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1097/04 N 473	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1116/04 N 481	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1116/04 N 482	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1116/04 N 483	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1116/04 AP 848	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1150/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG1202/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1216/04 01	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1216/04 05	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1230/04 07	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1230/04 08	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1265/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1482/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1486/04 AP 1073-04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1486/04 AP 1072-04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1569/04 01	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1569/04 02	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1578/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1616/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1737/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1839/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 1872/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 2204/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 2228/04 SV 376/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PG 2228/04 SV 377/04	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

<sup>a</sup>(+) Reação positiva na técnica de imunofluorescência indireta.

<sup>b</sup>(-) Reação negativa na técnica de imunofluorescência indireta.

# **PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA**

**Brazilian Journal of Veterinary Research**

Editada, a partir de 1981, em continuação aos  
"Arquivos do Instituto de Biologia Animal" (1959-1961)  
e à Série Veterinária (1968-1976) da "Pesquisa  
Agropecuária Brasileira"



**Colégio Brasileiro de Patologia Animal**  
[www.cbpa.org.br](http://www.cbpa.org.br)

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos, em 3 vias, escritos em português ou inglês, devem ser enviados, junto com disquete de arquivos (de preferência na versão mais recente do Word), ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Embrapa-CNPAB/PSA, 23851-970 Seropédica, Rio de Janeiro. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

**NOTE:** Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista.

Apesar de não serem aceitas comunicações ("Short communications") sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

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

**1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinações destes três últimos), AGRADECIMENTOS e REFERÊNCIAS:**

a) o *Título* do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;  
b) o *Abstract* deverá ser apresentado com os elementos constituintes do Resumo em português, podendo ser mais extenso. Ambos devem ser seguidos de "Index Terms" ou "Termos de Indexação";

c) o *Resumo* deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, Resumo e Abstract trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);

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

e) em *Material e Métodos* devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;

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

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

h) as *Conclusões* devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

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

j) a lista de *Referências*, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores (em caixa alta e baixa), o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences) e/ou "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC.), mas sempre seguindo o exemplo de apresentação no último fascículo da revista.

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

a) os trabalhos devem ser impressos em uma só face do papel, com margens de, no mínimo, 2,5 cm. O texto deve ser corrido, com as legendas das figuras e os Quadros no final. As Figuras (inclusive gráficos) devem ser salvados em arquivos separados, porque quando são salvados junto com o texto, carregam a extensão "doc" e

perdem as informações do programa onde foram gerados, resultando, assim, em má qualidade ou perda das imagens;

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

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo do(s) autor(es) e E-mail do autor para correspondência;

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

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na sua íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Cit. Fulano 19..)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto so-mente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das *Referências* deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

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

**4. As legendas explicativas das Figuras** conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, e serão apresentadas no final do trabalho.

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