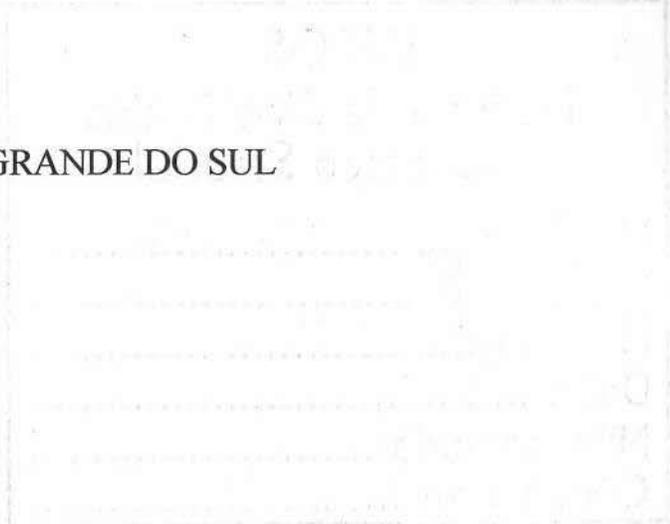


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS



Caracterização Genômica e Antigênica de Vírus da Doença de Aujeszky
Isolados no Estado do Rio Grande do Sul

Aluno: Vinicius de Albuquerque Sortica

Orientador: Prof^o 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**

Porto Alegre, dezembro de 2004

Caracterização Genômica e Antigênica de Vírus da Doença de Aujeszky Isolados no Estado do Rio Grande do Sul¹

Vinicius de A. Sortica^{2,4}, Alessandra D. da Silva^{2,3}, Alexandre C. Braga², Fernando R. Spilki^{2,3}, Ana C. Franco², Paulo A. Esteves^{2,3}, Fransciscus A. M. Rijsewijk⁵, Júlio C. A. Rosa², Helena B. C. R. Batista^{2,3}, Paulo M. Roehé^{2,4*}

¹Submetido em 10/12/2004

Aceito para publicação em ...

² FEPAGRO Saúde Animal - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS, Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS, Brasil

⁴ Departamento de Microbiologia, Laboratório de Virologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil, 90050-170.

⁵ Animal Sciences Group, PO Box 65, 8200 AB, Lelystad, The Netherlands

*Endereço Postal: Caixa Postal 2076, Porto Alegre RS Brasil CEP 90 001 970.

Tel.: 51. 481 37 11; Fax: 51. 481 33 37

*Email: proehe@ufrgs.br

ABSTRACT.- Sortica V.A., Silva A.D., Braga A.C., Spilki F.R., Franco A.C., Esteves P.A., Rijsewijk F.A.M., Rosa J.C.A., Batista H.B.C.R., Roehle P.M. 2004. **[Genomic and antigenic characterization of Aujeszky's disease virus isolates in Rio Grande do Sul State]** Caracterização Antigênica e Molecular de Vírus da Doença de Aujeszky Isolados no Estado do 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: vsortica@via-rs.net.

Pseudorabies or Aujeszky's disease (AD), caused by Aujeszky's disease virus (ADV) is a major concern in swine production. In the state of Rio Grande do Sul, Brazil, AD was only detected in cattle, in 1954. On March 2003, two outbreaks of encephalitis occurred in farms on the northern region of the state, close to the border with the state of Santa Catarina. ADV were isolated (8 isolates) from distinct farms within the region and subjected to genomic and antigenic analyses. Genomic characterization was carried out by restriction enzyme analysis (REA) of the whole viral genome with *Bam* HI. REA analysis revealed that all isolates from Rio Grande do Sul displayed a genomic type II arrangement, a genotype often found in other outbreaks of AD previously reported in other states within Brazil. Antigenic characterization with a panel of monoclonal antibodies (Mabs) directed to viral glycoproteins (gB, gC, gD and gE,) was performed in an immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) on infected cell monolayers. The antigenic profile of all isolates from Rio Grande do Sul displayed the same profile of reactivity. These findings suggest that the viruses isolated in Rio Grande do Sul have a common origin.

INDEX TERMS: Aujeszky's disease, pseudorabies, epidemiology.

RESUMO.- A Pseudorraiva ou Doença de Aujeszky (DA), causada pelo vírus da Doença de Aujeszky (VDA) é uma grande preocupação na suinocultura. No Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, a DA foi detectada apenas em um bovino, em 1954. Em março de 2003, dois surtos de encefalite ocorreram em granjas da região norte do Estado, perto da fronteira com o Estado de Santa Catarina. O VDA (8 amostras) foi isolado de diferentes granjas da região do surto e submetido a análises genômica e antigênica. A caracterização genômica foi realizada através de análises com endonuclease de restrição (REA) do genoma viral total, com a enzima *Bam* HI. A REA revelou que todos os isolados do Rio Grande do Sul apresentaram um arranjo genômico tipo II, o arranjo genômico mais frequentemente encontrado em outros surtos da DA previamente reportados em outros estados do Brasil. A caracterização antigênica foi realizada por imunoperoxidase frente a um painel de anticorpos monoclonais (Acms) dirigidos contra glicoproteínas virais (gB, gC, gD e gE). Todos os isolados do Rio Grande do Sul apresentaram o mesmo perfil de reatividade antigênica. Estes resultados sugerem que as amostras isoladas no Rio Grande do Sul provêm de uma origem comum.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doença de Aujeszky, pseudorraiva, epidemiologia

INTRODUÇÃO

O vírus da Doença de Aujeszky (VDA) pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (Murphy et al. 1999). Possui um genoma constituído por uma fita dupla de DNA com aproximadamente 150.000 pares de base (Kpb), que codifica cerca de 70 a 100 proteínas (Mettenleiter 1991). Também conhecida como Pseudorraiva, a Doença de Aujeszky é considerada uma importante causa de perdas econômicas em rebanhos de suínos, estando difundida em todo o mundo, inclusive no Brasil (Cândido et al. 2000, Piatti et al. 2001).

O VDA compartilha características comuns a outros membros da família *Herpesviridae* sendo capaz de, após uma infecção primária, migrar para gânglios nervosos, via terminações nervosas periféricas, podendo estabelecer latência, ou invadir o Sistema Nervoso Central (SNC). Quando ocorre o estabelecimento de latência, o animal torna-se uma fonte de disseminação viral durante toda sua vida, podendo o vírus reativar da latência quando o animal é sujeito a algum fator de estresse (Murphy et al. 1999, Sobestiansky et al. 1999).

A espécie suína é o principal reservatório, sendo a principal fonte de infecção para os hospedeiros secundários que incluem eqüinos, bovinos, ovinos, caprinos, caninos e felinos (Murphy et al. 1999). Em leitões não imunes, a enfermidade caracteriza-se por sinais de comprometimento nervoso e respiratório. Assim, as perdas relacionadas à DA são decorrentes das altas taxas de mortalidade e morbidade de leitões, queda da produtividade de reprodutores e redução do desenvolvimento dos animais em crescimento e terminação (Sobestiansky et al. 1999).

Em função das infecções latentes estabelecidas pelo vírus, este pode ocasionalmente vir a ser re-excretado pelos animais infectados, podendo disseminar a

infecção no rebanho. Animais latentemente infectados são potenciais fontes de infecção durante toda a vida (Sobestiansky et al. 1999).

No Estado do Rio Grande do Sul, o VDA foi detectado pela primeira vez em um bovino no ano de 1954 (Bauer 1955). Desde então, o vírus não foi mais detectado na região. Estudos sorológicos realizados posteriormente não detectaram a presença de anticorpos para a enfermidade, tanto em granjas comerciais de suínos domésticos (Oliveira et al. 1987, Roehle et al. 1996, Trevisol et al. 1995) como de javalis (Braga et al. 2002). Passados quarenta e nove anos do primeiro registro da DA no estado do Rio Grande do Sul, dois surtos da doença acometeram plantéis de suínos domésticos em granjas localizadas no norte do Estado, no ano de 2003.

Este artigo reporta os resultados dos estudos de caracterização genômica e antigênica de amostras do VDA isoladas no Rio Grande do Sul nos surtos ocorridos em 2003.

MATERIAIS E MÉTODOS

Vírus e células

Oito amostras de vírus denominadas EVI 011/03, EVI 149/03, EVI 151/03, EVI 174/03, EVI 176/03, EVI 177/03, EVI 192/03 e EVI 193/03 (Quadro 1), foram isoladas de órgãos de suínos que apresentavam sintomatologia clínica compatível com a DA após serem necropsiados. Os animais eram provenientes de granjas distintas presentes nas localidades do surto (Quadro 1), e haviam sido encaminhados para diagnóstico. O diagnóstico foi realizado através do isolamento viral em cultivos celulares e posterior confirmação da identidade dos isolados por imunoperoxidase utilizando anticorpos específicos contra proteínas do VDA (Rijsewijk com. pess.). A amostra NP (Bauer

1955) e a amostra NIA-3 (McFerran & Dow 1975) foram utilizadas como amostras padrão neste estudo (Quadro 1).

Os vírus foram isolados e multiplicados em células de linhagem de rim suíno (SK6) e de rim bovino (MDBK), rotineiramente mantidas em Meio Essencial Mínimo (MEM) contendo enrofloxacina (50 mg/L), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Nutricell).

Análise com endonuclease de restrição (REA)

O DNA viral das amostras NIA-3 (McFerran & Dow 1975) e NP (Bauer 1955), tomadas como padrão, e dos isolados foram extraídos como descrito por Franco et al. (2002). A REA foi realizada como descrito por Sambrook & Russel (2001) usando a enzima *Bam* HI. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,5% a 10V, corados com brometo de etídio e visualizados em um transiluminador com luz ultravioleta (UV).

Imunoperoxidase em monocamada (IPMA)

Os sobrenadantes das culturas celulares infectadas pelos vírus isolados onde o efeito citopático (ECP) foi evidenciado foram inoculados em monocamadas pré-formadas em placas de cultivo celular de 96 orifícios. Quando o ECP foi evidenciado, em cerca de 10-20% das células infectadas, as culturas foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS (pH 7.2). A IPMA foi realizada como descrito por Kramps et al. (1996).

Como anticorpo primário foi utilizado um painel de anticorpos monoclonais (Acms) dirigidos contra as glicoproteínas virais gB, gC, gD e gE (Rijsewijk com. pess.).

RESULTADOS

Todas as amostras isoladas dos focos da DA detectados no Rio Grande do Sul apresentaram o mesmo perfil de REA (Figs 1 e 2). O perfil apresentado pelas amostras é característico de um arranjo genômico tipo II (Herrmann et al. 1984), distinto daquele apresentado pela amostra padrão NIA-3 (tipo I) e igual ao apresentado pela amostra padrão NP (Figura 1). Não houve diferenças entre amostras isoladas de distintas granjas.

Na análise antigênica todas as amostras isoladas dos diferentes focos da doença no Rio Grande do Sul apresentaram o mesmo perfil de reatividade antigênica frente aos Acms utilizados. Igualmente, não houve diferenças entre os perfis apresentados pelas amostras isoladas e aqueles apresentados pelos vírus tomados como padrão.

DISCUSSÃO

Até a ocorrência do surto objeto do presente estudo, a doença de Aujeszky era tida como uma enfermidade exótica ao Estado do Rio Grande do Sul. O único caso anteriormente registrado da enfermidade no Estado ocorreu em 1954, no município de Guaporé, onde somente um animal da espécie bovina foi afetado (Bauer 1955). Esta situação epidemiológica justifica a necessidade de um aprofundamento no estudo das características das amostras isoladas no episódio de 2003. Após a confirmação do diagnóstico, o primeiro aspecto a ser analisado foi a verificação de possíveis variações entre as diferentes amostras isoladas do surto. Tanto a REA como a análise do perfil com Acms indicaram não haver diferenças entre as amostras isoladas do surto. Quanto ao perfil genotípico, todos os isolados apresentaram um arranjo genômico do tipo II, segundo classificação previamente proposta (Herrmann et al. 1984, Banks 1993, Capua et al. 1997, Yamada et al. 1992). Segundo essa classificação, os arranjos genômicos são

diferenciados pelo padrão obtido pela clivagem dos três fragmentos maiores originários da reação de restrição enzimática. O genótipo I tem sido encontrado nos Estados Unidos da América e Europa Central; o genótipo II tem sido descrito na Europa Central e no Japão; já o tipo III tem sido detectado apenas na Europa Norte (Herrmann et al. 1984, Banks 1993, Capua et al. 1997, Yamada et al. 1992). O genótipo II, que caracterizou as amostras isoladas no presente trabalho, tem sido o genótipo predominante em surtos de VDA ocorridos em outros estados, como Santa Catarina, Paraná e São Paulo, Brasil (Piatti et al. 2001).

A DA no Brasil tem sido registrada nos Estados de Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e São Paulo. Nestes, o controle da doença é realizado através de enquetes sorológicas e eliminação de animais soropositivos, sendo autorizada a vacinação em certas circunstâncias (Mores & Zanella 2003). A ocorrência de DA em Santa Catarina e a inexistência da mesma no Rio Grande do Sul, estados cuja fronteira é essencialmente delimitada pelo rio Uruguai, em sua maior parte, têm preocupado a todos os envolvidos na vigilância sanitária da região. A proximidade entre os estados aumenta a possibilidade da circulação do vírus. Contudo, ao longo de quarenta e nove anos não foi detectada a presença deste vírus no estado do Rio Grande do Sul, provavelmente em função do fluxo do comércio desses animais, que tende a levar animais do Rio Grande do Sul em direção ao norte, e não no sentido inverso (Oliveira et al. 1987, Roehle et al. 1996, Trevisol et al. 1995, Braga et al. 2002). Muito provavelmente, questões econômicas, tal como a queda de preço de leitões em determinado momento no Estado de Santa Catarina, parecem ter influenciado a mudança deste fluxo, o que provavelmente foi o fator determinante do surto objeto desse estudo.

Uma vez detectado o surto, tornou-se imperativo caracterizar as amostras circulantes, com o objetivo de determinar prováveis fontes de infecção. A proximidade

da região de ocorrência dos focos da fronteira com o Estado de Santa Catarina, associada ao perfil genômico e antigênico identificado nas amostras permitem concluir que a provável origem do surto foi o Estado vizinho.

Em conclusão, as análises aqui realizadas foram importantes para o traçamento epidemiológico da origem do surto. Além disso, esses dados permitiram que a vigilância epidemiológica na região fosse reforçada. Desde o episódio aqui descrito, não mais ocorreram surtos da enfermidade no Estado do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com suporte financeiro do CNPq, PRONEX, FAPERGS e CAPES. V.A.S. é bolsista PIBIC CNPq/UFRGS; H.B.C.R.B. é bolsista BAT CNPq; A.D.S. e P.A.E. são bolsistas de doutorado CAPES/PPGCIVET UFRGS; e P.M.R. bolsista pesquisador do CNPq.

Referências Bibliográficas

- Banks M. 1993. DNA restriction fragment length polymorphism among British isolates of Aujeszky's disease virus: use of the polymerase chain reaction to discriminate among strains. *Br. Vet. J.* 149: 155-163.
- Bauer A.G. 1955. Primeira constatação do mal de Aujeszky no Rio Grande do Sul. *Arq. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor* 1: 15-16.
- Braga A.C., Martin M.S., Oliveira S. J., Rosa J.C.A, Schmidt E., Martin C.R. 2002. Avaliação sorológica para a doença de Aujeszky em granjas comerciais de javalis

- (*Sus scrofa scrofa*) no Rio Grande do Sul. Congr. Bras. Med. Vet. Gramado, CDROM.
- Cândido A.L., Resende M., Oliveira M.E., Bontempo E.D., Drumond B.P. 2000. Partial characterization of a Brazilian strain of Aujeszky's disease virus recovered from a pig with subclinical infection. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 52: 4.
- Capua I., Casaccia C., Calzeta G., Caporale V. 1997. Characterization of Aujeszky's disease viruses isolated from domestic animals and from a wild boar (*Sus Scrofa*) in Italy between 1972 and 1995. *Vet. Microbiol.* 51: 143-149.
- Franco A.C., Rijsewijk F.A.M., Roehe P.M. 2002. Construction and characterization of a gE deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 33(3): 274-278.
- Herrmann S.C., Heppner B., Ludwig H. 1984. Pseudorabies viruses from clinical outbreaks and latent infections grouped into four major genome types. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 27: 378-401.
- Kramps J.A., Perrin B., Edwards S., van Oirschot J.T. 1996. A European inter-laboratory trial to evaluate the reliability of serological diagnosis of bovine herpesvirus 1 infections. *Vet. Microbiol.* 53: 153-161.
- McFerran J.B., Dow C. 1975. Studies on immunization of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 19(1): 17-22.
- Mores N, Zanella J.C. 2003. Programa de erradicação da doença de Aujeszky no Estado de Santa Catarina. XI Congr. Veterin. Esp. Suin. Goiânia, 126-131.
- Mettenleiter T.C. 1991. Molecular-biology of pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis.* 14 (2): 151-163.
- Murphy F.A., Gibbs E.P., Horzinek M.C., Studdert M.J. 1999. *Veterinary Virology*, 3rd Ed. academic Press, New York. 629.

- Oliveira S. J., Guizzard I.I., Vedar T., Oliveira L.G., Bruchamann H.E.A., Martins R.M., Roehe P.M., Bangel E.V. 1987. Testes sorológicos para o diagnóstico de leptospirose, peste suína africana e Doença de Aujeszky em granjas de reprodutores suínos no Rio Grande do Sul, ano 1984. *Arq. Med. Vet. Zoot.* 39(3): 451-460.
- Piatti R.M., Ikuno A.A., Cunha E.S., D'Ambros R., Gregori F., Soares R.M., Cortez A., Richtzenhain L.J. 2001. Characterization of aujeszky's disease virus isolates from south and southeast Brazil by RFPL analysis. *Braz. J. Microbiol.* 32: 144-146.
- Roehe P.M., Souza R., Salvo E.O., Martins R.M., Oliveira L.G., Hoffmann V.L., Rosa J.C.A., Trevisol I.M. 1996. Ausência de Anticorpos contra o vírus da doença de Aujeszky em suínos no Estado do Rio Grande do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 48(3): 393-367.
- Roizman B., Pellet P.E. 2001. In *Virology 4° Ed.* Knipe D. M., Howley P. M. Editors. Lippincott Willans & Wilkins. 2381-2848.
- Sambrook, J, Russel D.W. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3rd. Ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sobestiansky J., Barcellos D. E. S. N., Mores N., Oliveira S. J., Carvalho L. F. O. S., Moreno A. M., Roehe P. M. 1999. *Clínica e Patologia Suína 2° ed.* Goiânia, Goiás. 463-466.
- Trevisol I.M., Oliveira L.G., Roehe P.M. 1995. Ausência de anticorpos contra o vírus da Doença de Aujeszky em suínos no Estado do Rio Grande do Sul. In. *Cong. Bras. Veterin. Espec. Suin.* Blumenau. 99.
- Yamada S., Nishimori T., Shimizu M. 1992. Characterization of pseudorabies viruses recently isolated in Japan by restriction endonuclease assay. *J. Vet. Med. Sci.*, 54:541-549.

Legendas

Quadro 1. Amostras virais e origem do isolamento.

Figura 1. Arranjos genômicos dos vírus da Doença de Aujeszky após digestão com enzima *Bam* HI. M, marcador molecular λ Hind III; linha 1, NIA-3; linha 2, NP; linha 3, EVI 192/03; linha 4, EVI 193/03. Setas indicam bandas que caracterizam o genótipo I e o genótipo II.

Figura 2. Arranjos genômicos dos vírus da Doença de Aujeszky após digestão com enzima *Bam* HI. M, marcador molecular λ Hind III; linha 1, EVI 011/03; linha 2, EVI 149/03; linha 3, EVI 151/03; linha 4, EVI 174/03; linha 5, EVI 176/03; linha 6, EVI 177. Setas indicam bandas características do genótipo II.

Amostras Virais	Tecido de Isolamento	Local de Origem
EVI 011/03	cérebro	Pinheirinho do Vale/RS
EVI 149/03	cérebro	Aratiba/RS
EVI 151/03	cérebro	Aratiba/RS
EVI 174/03	cérebro	Aratiba/RS
EVI 176/03	cérebro	Aratiba/RS
EVI 177/03	cérebro e pulmão	Erechim/RS
EVI 192/03	cérebro e pulmão	Erechim/Ponte Preta/RS
EVI 193/03	cérebro	São Valentim/RS
NP ^a	cérebro	Guaporé/RS
NIA-3 ^a		Europa

^a Amostra padrão

Figura 1

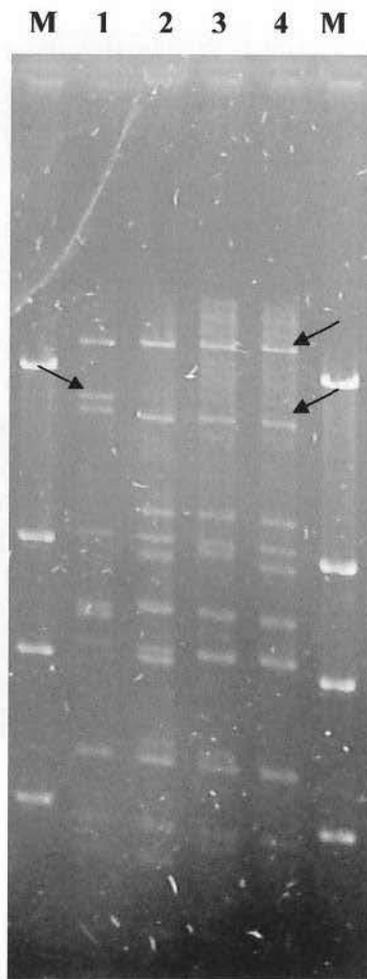
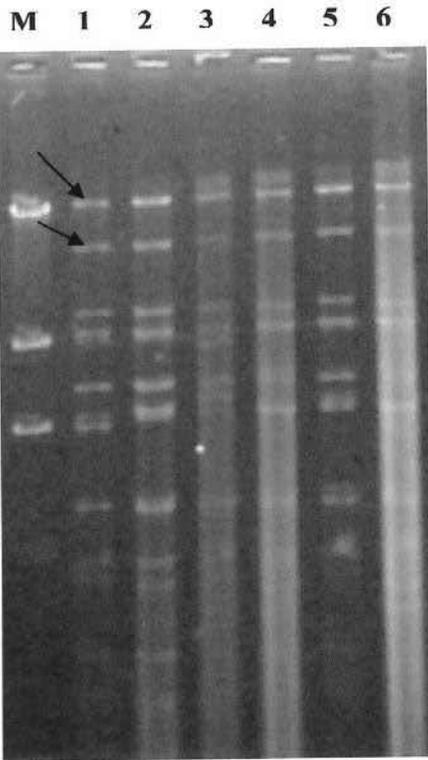


Figura 2



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

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.