

**MIELOENCEFALITE EQUINA POR PROTOZOARIO (MEP): REVISÃO DE
LITERATURA**
**EQUINE PROTOZOAL MYELOENCEPHALITIS (EPM): LITERATURE
REVIEW**

Amanda Camozzato TEIXEIRA¹; Lanny Kappes NOGUEIRA¹; Leticia Claudia
CHIODI¹; Matheus Roveri PIVETA¹; Raquel Jordana de Mello Pires de CARVALHO¹;
Rennê Leonardo Sant'ana GOMIERO².e Dauton Luiz ZULPO²

RESUMO

A mieloencefalite protozoária equina (MEP) é uma doença infecciosa causada principalmente pelo protozoário *Sarcocystis neurona* que produz disfunção neurológica no cérebro e na medula, porém pode ser causada também pelo *Neospora caninum* e *Neospora hughesi*. O equino é o hospedeiro acidental e o vetor do protozoário é o gambá (hospedeiros definitivos). Um exame é o teste imunológico do líquido, que proporciona um diagnóstico preciso. No tratamento é utilizado coccidioestático, antiinflamatório, vitaminas e analgésicos, e evitar que o hospedeiro definitivo tenha acesso aos alimentos dos equinos. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma revisão de literatura sobre mieloencefalite protozoária equina.

Palavras-chaves: Equinos, doenças infecciosas, *Sarcocystis neurona*.

ABSTRACT

Equine protozoal myeloencephalitis (EPM) is an infectious disease caused mainly by the protozoan *Sarcocystis neuron* that produces neurological dysfunction in the brain and marrow, but can also be caused by *Neospora caninum* and *Neospora hughesi*. The equine is the accidental host and the vector of the protozoan is the opossum (definitive hosts). An examination is the CSF test, which provides an accurate diagnosis. In the treatment coccidiostatic, anti-inflammatory, vitamins and analgesics are used, and to avoid that the definitive host has access to the food of the horses. The objective of the present work was to develop a literature review on equine protozoal myeloencephalitis.

Keyword: equine, infectious disease, *Sarcocystis neurona*.

¹ Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR- Toledo, PR, Brasil.

² Professores do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR- Toledo, PR, Brasil.

INTRODUÇÃO

A mieloencefalite protozoária equina (MEP) é uma enfermidade que acomete o Sistema Nervoso Central de equinos sendo causada pelos protozoários *Sarcocystis neurona*, *Neospora caninum* e *Neospora hughesi* (STELMANN e AMORIM, 2010), porém, o principal protozoário relacionado a enfermidade no Brasil é o *Sarcocystis neurona* (RIET-CORREA et al., 2001).

O protozoário se assemelha ao *Toxoplasma gondii*, o que remetia antigamente o diagnóstico da doença como toxoplasmose (STELMANN e AMORIM, 2010), sendo que os equinos entram no ciclo como hospedeiros acidentais. A transmissão ocorre pelo contato do equino com fezes de gambá, principalmente do gênero *Didelphis* (RADOSTITS et al., 2002).

A enfermidade acomete com maior frequência equinos a partir de quatro anos de idade, sendo que já foi descrita em potros jovens a partir de 2 meses e cavalos idosos até 19 anos. A infecção apresenta também uma prevalência elevada na raça Puro Sangue Inglês (RADOSTITS et al., 2002; RIET-CORREA et al., 2001).

O primeiro relato da doença foi em 1970 nos Estados Unidos, depois de um histórico de 52 equinos acometidos por doença neurológica. Inicialmente, acreditava-se que o agente etiológico era o *Toxoplasma gondii* (REGO, 2000). Em 1974, a doença foi denominada por BEECH (1974) como “Encefalomielite Protozoária Equina”, e modificada por (MAYHEW et. al., 1976) para “Mieloencefalite Protozoária Equina”. Alguns anos depois, identificado por DUBEY et. al. (2001), o protozoário causador como *Sarcocystis neurona*, e este atualmente é conhecido como o real agente etiológico da MEP.

Nos anos 90, começaram a surgir relatos de neosporose, tanto em recém-nascidos, adultos, e também em fetos prematuros (Dubey & Porterfield, 1990). Alguns dos recém-nascidos apresentavam ainda sinais neurológicos, onde ao exame microscópico foi identificado um cisto de *Neospora caninum* na musculatura ocular (LINDSAY et. al. 1996). Neste mesmo período, uma égua foi diagnosticada com

¹ Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

² Professores do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

Neosporose e apresentou sinais clínicos de, paresia de membros pélvicos, alteração de comportamento e disfagia, alterações estas que podem estar relacionadas ao sistema nervoso central.

Daft et. al. (1996), estudando casos suspeitos de neosporose em equinos, realizaram exame de imunoistoquímica, onde foram identificados taquizoítos de *Neospora caninum* e cistos teciduais do protozoário na medula espinhal, cérebro e nervos periféricos. Em outro caso, foi realizado cultivo celular de cérebro e medula, isolando *N. caninum* de um equino que apresentava sinais neurológicos (MARSH et. al. 1998).

Segundo Marsh et. al. (1998) isolou um protozoário com características diferentes do *Neospora caninum*, sendo a partir deste momento identificado como *Neospora hughesi*, outro protozoário envolvido na Mieloencefalite Equina por Protozoário.

BIOLOGIA

O ciclo assexuado do *Sarcocystis neurona*, tem início quando o oocisto é formado, no tubo digestivo do hospedeiro definitivo, e eliminado. Após a sua eliminação se dá a esporulação, que é caracterizada pelo aumento de volume do parasito e pela produção de esporozoítos no seu interior. O tempo da esporulação depende das condições ambientais do solo onde está o oocisto. A esporulação só estará completa quando cada esporoblasto formar esporozoítas, que é o que caracteriza o oocisto infectante. No caso do *Sarcocystis*, o processo da esporulação deve produzir, no interior do oocisto, dois esporocistos, sendo que cada um deve conter quatro esporozoítos (TENTER, 1995). (Figura 1)

Os cavalos se infectam após a ingestão de esporozoítos de *Sarcocystis neurona* que, penetram nas células do endotélio intestinal e evoluem para merozoítos, no qual são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e se instalam no Sistema Nervoso Central (RIET-CORREA et al., 2001). A recuperação e sobrevivência dos animais

¹ Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

² Professores do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

acometidos depende do grau das lesões, pois indivíduos com sinais clínicos moderados ou severos tem menor probabilidade de se recuperar e permanecem em decúbito (BACCARIN et al., 2001).

O gambá (*Didelphis virginiana* encontrada na América do Norte e o *Didelphis albiventris* encontrado na América do Sul), animal habitualmente encontrado no meio rural, é o hospedeiro definitivo do *Sarcocystis neurona*. Os hospedeiros intermediários são tatus, aves, marsupiais e insetos (RADOSTITIS et al., 2002). Em relação ao *Neospora hughesi*, não se tem relatos dos seus hospedeiros definitivos, nem relatos de casos no Brasil (MACKAY, 2003; PIMENTEL et al, 2003).

A transmissão do *S. neurona* ocorre através da eliminação de esporocistos nas fezes. O cavalo ingere água ou alimentos com a presença do protozoário e os esporocistos migram através da circulação sanguínea até o Sistema Nervoso Central (DUBEY, MILLER, 1986; REJMANEK et. al., 2009).

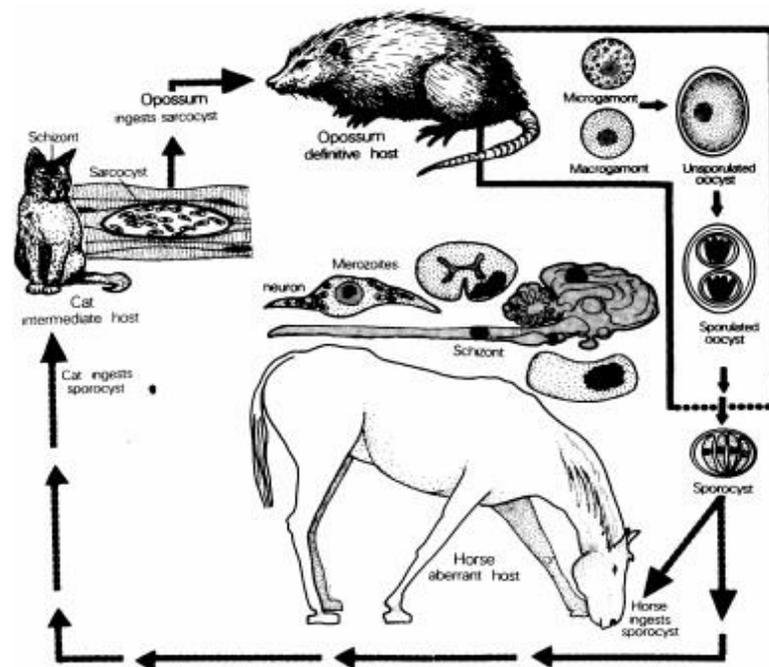


FIGURA 1: Ciclo de vida do *Sarcocystis neurona*(Dubey et. al, 2001)

¹ Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

² Professores do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

PATOGENIA

O *Sarcocystis neurona* é encontrado na forma de esquizontes e merozoítos em neurônios e outras células neurais. Os esquizontes penetram nestas células e lá se multiplicam levando a uma reação inflamatória e infecção, assim surgem os danos neurológicos ocasionando déficit de propriocepção, atrofia muscular e fraqueza (DUBEY, et. al. 2001).

Já o *Neospora hughesi* é encontrado na forma de cistos teciduais principalmente em retina e no sistema nervoso central. Nos casos onde foram encontrados taquizoítos, estes foram relatados presentes no cérebro e na medula espinhal e os bradizoítos em cérebro (LINDSAY, et. al. 1996).

SINAIS CLÍNICOS

O aparecimento dos sinais clínicos vai depender da região afetada e do tamanho da lesão no Sistema Nervoso Central (RIET-CORREA, 2001; SMITH, 2006). Sua evolução pode ser gradual ou até mesmo uma progressão muito rápida. Apesar dos animais apresentarem uma perda de peso rápida, os parâmetros vitais se apresentam dentro da normalidade (DUBEY et. al., 2001).

No início da apresentação dos sinais clínicos, o animal arrasta as pinças, normalmente tropeça no solo, e ainda tem incoordenação (THOMASSIAN, 2005). Se a lesão for em neurônio motor inferior da medula espinhal o animal vai apresentar paresia e posição de decúbito (VASCONCELLOS, 1995). Lesões em nervos cranianos levam a depressão, flacidez, paralisia da língua e ataxia (CORREA F. R., 2002)

Apesar dos sinais dependerem do local das lesões, muitas vezes os animais apresentam convulsões, andar em círculos, decúbito agudo e o ato de pressionar a cabeça contra objetos (RADOSTITS, et. al. 2002).

¹ Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

² Professores do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

A MEP pode comprometer o sistema nervoso central acarretando fraqueza muscular, incoordenação motora, sinais de atrofia muscular e paralisia de nervos cranianos (MOÇO et al., 2008).

DIAGNÓSTICO

Um bom prognóstico para a doença depende de um rápido diagnóstico. Isso se deve a importância de um bom exame neurológico, adequada interpretação dos sinais clínicos e a realização dos exames complementares (DUBEY et. al., 2001).

Para um diagnóstico preciso e definitivo da infecção por *Sarcocystis neurona* temos vários métodos analíticos, aos quais, a utilização do hemograma que não é diagnóstico para a MEP, mas auxilia na exclusão de outras doenças semelhantes. Já a análise do líquido cefalorraquidiano vai auxiliar o clínico a diferenciar se é uma doença neurológica infecciosa ou não (DUBEY et. al., 2001).

A albumina não é produzida no líquido cefalorraquidiano, portanto, se o quociente de albumina ou a concentração de albumina estiverem altas, isso pode significar um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (DUBEY et. al., 2001).

Para a detecção de anticorpos de *Sarcocystis neurona*, o teste mais utilizado atualmente é o SAG-ELISA que é preparado com peptídeos recombinantes de antígenos de superfície (rSnSAG2/4/3). A reação em cadeia pela polimerase (PCR) vai confirmar a presença do protozoário identificando o seu DNA. Mas para o *S. neurona* não tem se mostrado efetivo, pois este é destruído rapidamente pelas enzimas do líquido cefalorraquidiano (MARSH et. al., 1998).

Para *Neospora hughesi* pode ser utilizado o ELISA de SAG1 (rNhSAG1) (YEARGAN et. al., 2013), também outros métodos sorológicos podem ser utilizados, tais como, reação de imunofluorescência) e western blot. Todos estes identificando anticorpos contra o agente (LOCATELLI-DITTRICH et. al., 2006). Testes

¹ Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

² Professores do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

parasitológicos como isolamento *in vitro* e *in vivo*; PCR; exames histopatológicos também podem auxiliar no diagnóstico (LOCATELLI-DITTRICH et. al., 2006).

Após a morte do animal é utilizado como diagnóstico conclusivo o uso da histopatologia, imuno-histoquímica, PCR e isolamento do agente (SOUSA, 2013).

TRATAMENTO

O tratamento deve ser instituído o mais rápido possível, para que aumentem as chances de melhora do animal (DUBEY et. al., 2001);

Como medicação, recomenda-se atualmente a associação de Pirimetamina com dose de 1mg/kg, via oral, uma vez ao dia, com Sulfadiazina na dose de 20 mg/kg, via oral, BID, com duração de quatro a seis meses (DUBEY, 2001; RIET-CORREA, 2001).

Flunixin Meglumina ou Fenilbutazona na dose de 1,1 mg/kg, intravenoso, BID, por até sete dias podem ser os anti-inflamatórios de eleição. Além disso é aconselhável a suplementação com Tiamina, Vitamina E e Ácido Fólico (FENGER et. al., 1997).

Outro tratamento alternativo é a utilização de Nitazoxanida na dose de 25 mg/kg SID durante os primeiros sete dias de tratamento, e aumentar a dose para 50 mg/kg SID pelos próximos vinte e três dias (STELMANN, AMORIM, 2010).

Animais que não respondem bem a essa terapia, o indicado é o tratamento com Diclazuril (coccidiostático de rápida absorção) em dose de 5,6mg/kg, via oral, SID, por 28 dias. Outro possível tratamento é com a utilização de Toltrazuril na dose de 10mg/kg, via oral, SID também por 28 dias (RIET-CORREA, 2001).

CONCLUSÃO

O diagnóstico da MEP somente é possível pelo reconhecimento do protozoário no SNC e da presença de anticorpos contra o *S. neurona* no líquido cefalorraquidiano, por acometer o sistema nervoso central.

¹ Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

² Professores do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

Para seu tratamento recomenda-se o isolamento do animal cometido para, assim, diminuir a propagação da enfermidade e melhorar o sucesso do tratamento.

Por se tratar de uma doença que acomete o SNC e pode levar o animal a sequelas mesmo após o tratamento, recomenda-se bloquear o acesso de gambás ao estábulo e dependências, boa higiene referente ao armazenamento e manipulações das rações dos animais, bebedouros e cocheiras, requisitando exames e histórico dos novos animais que serão introduzidos na propriedade, pode ser uma prevenção da doença.

¹ Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

² Professores do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACCARIN, R.Y.A.; FERNANDES, W.R.; VINCENZI, R.C.; REGO, E.B.; SILVA, L.C. Estudo da Terapia e Evolução Clínica da Mieloencefalite Protozoária Equina. **Veterinaria Noticias**. v. 7, n.2, p. 79-85, 2001.

BEECH, J. Equine protozoan encephalomyelitis. **Vet Med Small Anim Clin**. 69: 1562– 6. 1974;

CORREA F. R., CORREA G. R, SCHILD A. L. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e eqüídeos **Pesq. Vet. Bras**. vol.22 no.4 Rio de Janeiro Oct./Dec. 2002

DAFT, B. M.; BARR B. C.; COLLINS N.; SVERLOW K. Neospora encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. **Equine Vet J**. 1996; 28: 240–3.

DUARTE, P. C.; DAFT. B. M.; CONRAD, P. A.; PACKHLAM, A. E.; GARDNER, I. A. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two Western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. **J Vet Diagn Invest** 15:8–13. 2003.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SAVILLE, W. J. A.; REED, S. M.; GRANSTROM, D. E. SPEER, C. A. A review of Sarcocystis neurona and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Vet Parasitol.**; 95: 89 -131. 2001

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; KERBER, C. E.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; et. al. First isolation of Sarcocystis neurona from the South American opossum, Didelphis albiventris, from Brazil. **Vet Parasitol**. 95: 295–304. 2001; b

DUBEY, J. P.; DAVIS, S. W.; SPEER, C. A.; BOWMAN, D. D.; DE LAHUNTA A.; GRANSTROM D. E.; Sarcocystis neurona sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. **J Parasitol.**; 77: 212–8. 1991.

¹ Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR- Toledo, PR, Brasil.

² Professores do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR- Toledo, PR, Brasil.

DUBEY, J.P.; PORTERFIELD, M. L. Neospora caninum (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. **J Parasitol.** 76: 732-4. 1990.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of Neospora caninum and neosporosis. **Vet Parasitol.**; 67: 1-59;1996

DUBEY, J. P, MILLER, S. Equine protozoal myeloencephalitis in pony. **J. Am. Vet. Med Assoc.** v188, pag 1311-1312, 1986.

FENGER, C. K.; GRANSTROM, D. E.; GAJADHAR, A. A.; WILLIAMS, N. M; MCCRILLIS, S. A.; STAMPER, S; et. al. Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using Sarcocystis sp. sporocysts from the opossum (Didelphis virginiana). **Vet Parasitol.** 68: 199–213. 1997;

LINDSAY D. S.; STEINBERG H.; DUBIELZIG R. R.; SEMRAD S. D.; KONKLE D. M.; MILLER P. E. Central nervous system neosporosis in a foal. **J Vet Diagn Invest.**; 8: 507-10. 1996.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; HOFFMANN, D. C. S.; DITTRICH, J. R. Neosporose Equina – Revisão. **Arch Vet Sci.**; 11: 1-10. 2006

MACKAY, R. J. Equine protozoal myeloencephalitis. In:ROBINSON,E. **Current Therapy in Equine Medicine 5.** Gainesville - Florida: Saunders, p.69-74. 2003,

Mayhew IG, De Lahunta A, Whitlock RH, Pollock RVH. Equine protozoal myeloencephalitis. In: **Proceedings of the 22nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**; 1976, Dallas. Dallas: AAEP; 1976. p.107–14

MARSH, A. E.; BARR B. C.; MADIGAN J. E.; CONRAD, P. A. In vitro cultivation and characterization of a Neospora isolate obtained from a horse with protozoal myeloencephalitis. In: **Proceedings of the American Society Parasitology and the Society of Protozoologists**; Arizona. Arizona; 1996. Abstract 114. 1996

MARSH, A. E.; BARR B. C.; PACHAM, A. E.; MADIGAN J. E.; CONRAD, P. A. Description of a new Neospora species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **J Parasitol.**; 84: 983-91. 1998.

¹ Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

² Professores do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; MADIGAN, J. E. CONRAD, P. A. In vitro cultivation and characterization of a Neospora isolate obtained from a horse with protozoal myeloencephalitis. In: **Proceedings of the American Society Parasitology and the Society of Protozoologists**; Arizona; 1996.

MOÇO, H. F.; RAYA, D. A.; DIAS, L. C. Mieloencefalite Protozoária Equina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária ACEG – Garça – SP, ano VI, número 11, julho de 2008.**

PIMENTEL, L. F. R. O. et. al. Effects of diclazuril and folic acid, ascorbic acid tocoferol, tiamin and cianocobalamin in tratament of EPM: Clinical Relatory. **8th Congress of World Equine Veterinary Assotiation**. Buenos Aires - Argentina, p.15-17, 2003.

RADOSTITS, M.; GAY, C.; BLOOD, C.; HINCHCLIFF, W. **Clinica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1187 a 1189. 2002.

REJMANEK D.E., et al. Prevalence and risk factors associated with Sarcocystis neurona infections in opossums (Didelphis virginiana) from central California. **Veterinary Parasitology**. v.166, p.8-14, 2009.

REED, S.M.; BAYLY, WM. **Medicina Interna Eqüina**, Rio de Janeiro: Guanabara.pag 419-422. 2000.

REGO, E. B. MEP mieloencefalite protozoária eqüina - um dos causadores de bambeira. 2000. Disponível em: <<http://www.cavalo.com.br/conteudo.asp?id=31&area=3>>. Acesso em 29/04/2017.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, R.; **Doenças de ruminantes e equinos**. São Paulo: Livraria. Varela. Vol. II, 574 p. 2001

SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. V. 2. Ed..Manole, São Paulo.1738p. 1994.

SMITH, B P; **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**; v. 1, 3ª edição; Manole LTDA; Barueri; p. 1148-1159. 2006.

¹ Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

² Professores do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

SOUSA, S. K. H. Doenças Neurológicas em equinos no Distrito Federal e Goiás: estudo retrospectivo (2003-2013). 64p. **Monografia – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária**. Brasília, 2013.

STELMANN, U.J.P.; AMORIM, R.M. Mieloencefalite protozoária equina. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 2010 jun.;17(2): 163-176.

TENTER, A.M. Current research on Sarcocystis Species of domestic animals. **International J Parastitol**, 25(11):1311-1330, 1995.

VASCONCELLOS, L. A. S.; **Problemas Neurológicos na Clínica Equina**, 1^a Edição Editora Varela, São Paulo, p. 33 a 36. 1995.

THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos Cavalos**; 4^a edição; Editora Livraria Varela.São Paulo, p. 181-194. 2005

YEARGAN, M. R., ALVARADO-ESQUIVEL, C., DUBEY, J. P., HOWE, D. K. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi* in horses from Mexico. **Parasite.**, v.1, n.1, p..20-29, 2013.

¹ Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.

² Professores do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR-Toledo, PR, Brasil.